

ÉRICA CRISTINA RAMÍREZ BAGGIO

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE PASTEURIZADO PELOS  
MÉTODOS DE CCD E CLAE UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas

CURITIBA

2006

Baggio, Érica Cristina Ramírez  
Determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado pelos métodos  
de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade / Érica Cristina  
Ramírez Baggio. — Curitiba, 2006.  
xv, 95 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Alimentos.

Orientador: Renato João Sossela de Freitas

1. Aflatoxina. 2. Leite – Contaminação I. Freitas, Renato João  
Sossela de. II. Título.

CDD 20 664.07



## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico este trabalho aos meus pais, Dorival e Irene, pelo amor incondicional, aos meus irmãos, Junior e Luis Henrique e ao meu namorado Marcos Paulo que me apoiaram e incentivaram neste momento tão importante da minha vida profissional.

## AGRADECIMENTOS

---

Quero agradecer a Deus que sempre esteve ao meu lado, me dando forças para trilhar o caminho escolhido por mim, fazendo-me acreditar cada vez mais que Ele está presente a cada passo que dou. Deus, o Senhor ajudou demonstrando seu amor incondicional por mim e provando a mim mesma, entre muitos obstáculos que a vida impõe, que conseguiria chegar até o fim.

Ao meu pai Dorival, à minha mãe Irene, aos meus irmãos Junior e Luis Henrique, minha família querida e que muito amo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos e decisões. Pai e mãe, sou muito grata ao amor que vocês demonstram por mim, mas devo agradecer também pelo apoio financeiro e confiança que sempre me deram para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Vocês sabem o quanto foi difícil ficar longe da minha família, e, mesmo, em meus momentos de fraqueza vocês se mantiveram firmes para me dar forças e não me deixaram desistir nunca podendo chegar até aqui. Muito obrigada mesmo!!

Ao meu amor Marquinho, que sempre acreditou em mim, e que, mesmo longe, me ajudou na concretização de mais este sonho. Pela paciência que teve e tem comigo, pelo carinho, atenção e amizade. Muito obrigada!!

Ao meu orientador Professor Doutor Renato João Sossela de Freitas, pela confiança e pela valorosa contribuição e incentivo nas orientações durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Masson, Paulo Fontoura, Dr. Renato João Sossela de Freitas e Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Chaves Haracemiv, pelos ensinamentos.

Agradeço também ao Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN/PR, em especial ao Diretor Marcelo Pilloneto, pela possibilidade de realizar este trabalho no Laboratório de Físico-química, da Divisão de Produtos.

À Leonir Bittencourt Eizendeher, pela amizade, pelo incentivo, pelos conhecimentos e ensinamentos e por muitas vezes ‘minha mãezona’. Léo, do fundo do coração, agradeço não só pela imensa contribuição neste trabalho, mas também pelas longas conversas que tivemos, sendo que nestas me ensinou a enfrentar os

obstáculos que aparecem em nosso caminho, pelos conselhos e pela paciência de me ensinar com tanto amor. Sua amizade é de fundamental importância!!

Às amigadas sólidas que conquistei no LACEN/PR da Ana Maria, Angélica, Carmen, Higashyama, Júlia, Leonir, Maria Emília, Marvina, Lilinha e Wanda, pelo apoio e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

Aos técnicos do LACEN/PR Júlio e Jandira, pela colaboração neste trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos Paulo Roberto Krainski, pela amizade e competência no atendimento às minhas necessidades.

Às queridas amigas do mestrado, Dayane Karina Lorenzetti, Giovana Longo, Katielle Rosalva Vonic Córdoba, Nelisa Sita Pires Picolotto Martim, Thaís Martins Marcheze Tavares Bastos Gama e Vanessa Haddad Kalluf, pela amizade, carinho, incentivo e força.

À amiga Andréa Emilia Marques Stingen, pela ajuda e incentivo para que eu pudesse fazer o mestrado.

À querida amiga Giovana Longo, pela pronta disponibilidade de ajudar em parte deste trabalho, pelo carinho e amizade. Gi, muito obrigada mesmo!!

À minha querida amiga e agora mamãe Thaís Martins Marcheze Tavares Bastos Gama, pelas longas conversas que tivemos, em especial numa viagem para um congresso em Goiânia, pelos conselhos, carinho e uma grande amizade. Como é bom conhecer pessoas tão especiais como você Thaís, obrigada pela amizade!!

A todos meus familiares que incentivaram, apoiaram e me acolheram, em especial à minha querida prima Cristiane Hatsuko Baggio e à minha tia Maria de Lourdes Baggio.

Às professoras Doutora Márcia Regina Beux e Doutora Patrícia Teixeira P. S. Penteado que participaram da banca do exame de qualificação e de defesa, pelo auxílio e contribuições para a melhoria deste trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro possibilitando dedicação ao mestrado.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho, seja através de conselhos, conversas e àquelas que torcem por mim!!

---

Mantenha sempre viva a esperança  
Acredite, não deixe nunca de acreditar, que a maré sempre volta  
Dê-se conta de que em você existe um potencial maior do que suspeita  
Para usar uma frase antiquada mas poderosa  
"Ouse ser o que você deseja e pode ser"  
Jamais aceite um não como resposta  
Se de início você não está obtendo êxito, tente, tente de novo  
Não se deixe abater pelas circunstâncias  
Insista sempre - tente sempre - aí está o segredo  
Dê o melhor de si e deixe o resto nas mãos de Deus  
Esqueça-se do FPL: Falta, Perda e Limitação  
Risque-o do seu vocabulário  
Mantenha a imagem da vida que deseja e faça com que  
essa imagem se torne um fato  
Esforce-se sempre; tente sempre  
E não se esqueça da oração. Ela é uma Fonte de Força  
E lembre-se.... lembre-se sempre....  
QUERER É PODER!!

(Norman Vincent Peale)

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 – OBJETIVOS.....	2
1.1.1 – Objetivo Geral.....	2
1.1.2 – Objetivos Específicos.....	3
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 – MICOTOXINAS.....	4
2.1.1 – Fungos Produtores de Micotoxinas.....	6
2.1.2 – Principais Micotoxinas.....	10
2.1.2.1 – Aflatoxinas.....	10
2.1.2.2 – Ocratoxinas.....	15
2.1.2.3 – Fumonisinas.....	17
2.1.2.4 – Zearalenona.....	19
2.1.2.5 – Tricotecenos.....	20
2.2 – AFLATOXINAS E CARCINOGENICIDADE.....	21
2.3 – AFLATOXINAS B <sub>1</sub> E M <sub>1</sub> .....	23
2.4 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B <sub>1</sub> .....	27
2.5 – AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	33
2.5.1 – Importância do Leite.....	33
2.5.2 – Aflatoxina M <sub>1</sub> em Leite e Derivados.....	36
2.5.3 – Métodos de Análise de CCD e CLAE para Aflatoxina M <sub>1</sub> em Leite Associados à Coluna de Imunoafinidade.....	39



<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
3.1 – MATERIAL	43
3.1.1 – Amostras	43
3.1.2 – Coluna de Extração	43
3.1.3 – Reagentes	43
3.1.4 – Equipamentos e Materiais Diversos	44
3.2 – MÉTODOS	44
3.2.1 – Solução Padrão de Aflatoxina M <sub>1</sub>	44
3.2.2 – Curva de Calibração	46
3.2.3 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método	47
3.2.4 – Fortificação das Amostras de Leite para Teste de Recuperação	47
3.2.4.1 – Método de CCD	47
3.2.4.2 – Método de CLAE	48
3.2.5 – Determinação de Aflatoxina M <sub>1</sub>	48
3.2.5.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	48
3.2.5.1.1 – Preparação e tratamento da amostra	48
3.2.5.1.2 – Separação, quantificação e confirmação	49
3.2.5.1.3 – Cálculo	50
3.2.5.1.4 – Diagrama	50
3.2.5.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
3.2.5.2.1 – Preparação e tratamento da amostra	52
3.2.5.2.2 – Separação, quantificação e confirmação	52
3.2.5.2.3 – Cálculo	53
3.2.5.2.4 – Diagrama	53
3.2.6 – Análise Estatística	55
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
4.1 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS	56
4.1.1 – Determinação da Concentração do Padrão de Aflatoxina M <sub>1</sub>	56
4.1.2 – Método de Cromatografia em Camada Delgada	56
4.1.2.1 – Resultados dos Ensaios de Recuperação da AFM <sub>1</sub> em Amostras de Leite	56
4.1.3 – Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	57

4.1.3.1 – Resultados dos Ensaaios de Recuperação da AFM <sub>1</sub> em Amostras de Leite.....	58
4.1.3.2 – Curva de Calibração.....	59
4.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE LEITE PASTEURIZADO PELO MÉTODO DE CCD E CLAE.....	61
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFM<sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,1 µg/L.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE 2 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFM<sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE 3 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,06 µg/L.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE 4 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µg/L.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE 5 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,17 µg/L.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1</b> – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS AFLATOXINAS.....	12
<b>FIGURA 2</b> – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA AFLATOXINA B <sub>1</sub> .....	29
<b>FIGURA 3</b> – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B <sub>1</sub> .....	31
<b>FIGURA 4</b> – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE.....	41
<b>FIGURA 5</b> – SISTEMA DE FILTRAÇÃO A VÁCUO DA AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	49
<b>FIGURA 6</b> – DESENVOLVIMENTO DA PLACA CROMATOGRÁFICA.....	50
<b>FIGURA 7</b> – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	51
<b>FIGURA 8</b> – CROMATOGRÁFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA.....	53
<b>FIGURA 9</b> – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	54
<b>FIGURA 10</b> – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADÃO DE AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	59
<b>FIGURA 11</b> – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M <sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,06 µg/L.....	60
<b>FIGURA 12</b> – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M <sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L.....	60
<b>FIGURA 13</b> – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µg/L DE AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	63

## LISTA DE TABELAS

---

<b>TABELA 1</b> – LIMITES MÁXIMOS ADMISSÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE, AMENDOIM E MILHO.....	14
<b>TABELA 2</b> – LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL PARA AFLATOXINA M <sub>1</sub> EM LEITE E DERIVADOS DE LEITE PARA CONSUMO HUMANO.....	24
<b>TABELA 3</b> – CONSUMO MÍNIMO DE LEITE PARA O HOMEM.....	35
<b>TABELA 4</b> – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	57
<b>TABELA 5</b> – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	58
<b>TABELA 6</b> – RESULTADOS DOS NÍVEIS DE AFLATOXINA M <sub>1</sub> ENCONTRADOS NO LEITE PASTEURIZADO PELOS MÉTODOS DE CCD E CLAE UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

AFs	Aflatoxinas
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UR	Umidade Relativa
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
kg	Quilograma
L	Litro
OTA	Ocratoxina A
pH	Potencial Hidrogeniônico
ng	Nanograma
bw	Body Weight
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
SNC	Sistema Nervoso Central
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
TCT	Tricoceteno
DON	Deoxinivanelol

NIV	Nivalenol
CHC	Carcinoma Hepatocelular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HBV	Vírus da Hepatite B
DT	Dose Média
pmol	Picomol
DL <sub>50</sub>	Dose Letal <sub>50</sub>
ppb	Parte por Bilhão
RNA	Ácido Ribonucléico
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFB <sub>2a</sub>	Aflatoxina B <sub>2a</sub>
AFP1	Aflatoxina P1
AFL	Aflatoxicol
min	Minuto
seg.	Segundo
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
mm	Milímetro
mM	Milimol
UV	Ultravioleta
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dicromato de Potássio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
M	Molar
rpm	Rotação por Minuto
nm	Nanômetro
sol.	Solução
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
r <sup>2</sup>	Coeficiente de Correlação
UHT	Ultra High Temperature

## RESUMO

---

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais, quando presentes nos alimentos e rações. Dentre as micotoxinas pesquisadas, a aflatoxina é uma das principais e mais estudadas. O leite e seus derivados são os principais nutrientes para o homem, especialmente as crianças que são mais sensíveis aos efeitos das micotoxinas. Entretanto, estes produtos podem estar contaminados com aflatoxina  $M_1$  (AFM<sub>1</sub>), um perigo para a saúde humana devido seus efeitos tóxicos no organismo como carcinogenicidade e mutagenicidade. Tendo em vista a importância da AFM<sub>1</sub>, este trabalho tem por objetivo verificar os níveis de AFM<sub>1</sub>, limite de detecção e de quantificação em leite pasteurizado tipo C comercializado no Estado do Paraná pelos métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de imunoafinidade como técnica de purificação. Foram analisadas 40 amostras de leite pasteurizado, tipo C, coletadas em 21 Distritos Sanitários do Estado do Paraná no período de dezembro/05 a março de 2006. Para o método de CCD, o limite de detecção observado foi de 0,01 µg/L e o limite de quantificação foi de 0,02 µg/L. As recuperações variaram entre 83,3%-93,3% e os coeficientes de variação foram inferiores a 6%, demonstrando uma alta eficiência do método para níveis mais baixos. AFM<sub>1</sub> foi encontrada em 42,5% das amostras analisadas. Para o método de CLAE, o limite de detecção observado foi de 0,0085 µg/L e o limite de quantificação foi de 0,01 µg/L. As recuperações variaram entre 82%-100% e os coeficientes de variação foram inferiores a 14,6%. AFM<sub>1</sub> foi encontrada em 57,5% das amostras analisadas. O teste t de Student revelou que os resultados das análises de AFM<sub>1</sub> no leite por CLAE não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos por CCD ao nível de 5% de significância. Todas as amostras estão dentro do limite máximo permitido no Brasil, pela Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002, que é de 0,5 µg/L, e somente 20% (CLAE) e 25% (CCD) estariam com níveis de AFM<sub>1</sub> acima de 0,05 µg/L, que é a tolerância exigida por alguns países da Europa. Os resultados encontrados para AFM<sub>1</sub> em leite pasteurizado tipo C comercializado no Estado do Paraná revelaram baixo nível de contaminação. Entretanto, há a necessidade de um monitoramento por um período mais longo, incluindo todas as estações do ano, para confirmar essa tendência.

**PALAVRAS-CHAVE:** aflatoxina  $M_1$ , leite, CCD, CLAE, coluna de imunoafinidade, micotoxinas.

## ABSTRACT

---

The mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi and represent a potential risk to the man and animals' health when present in foods and foodstuff. Amongst the mycotoxins studied the aflatoxins is one of the most studied. Milk and its derivatives are the main nutrients to the man, especially children, who are the most sensible to the mycotoxins effects. However, these products can be contaminated with aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), a danger for human health for its toxic effects into the organism, like carcinogenicities and mutability. Watching the AFM<sub>1</sub> importance, this work wants to verify the AFM<sub>1</sub>'s levels, limit of detection and quantify it in pasteurized milk, C sort commercialized in Paraná State through thin-layer chromatography (TLC) and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using immunoaffinity column as purification technique. 40 samples of pasteurized milk C sort were analyzed, taken in 21 sanitary Districts of Paraná State in period from december/2005 to march/2006. To the TLC method, the limit of detection observed was 0.01 µg/l and quantification limit was 0.02 µg/l. The recuperation varied between 83.3% – 93.3% and variation coefficient was lower than 6%, showing a high efficiency of method to smaller levels. AFM<sub>1</sub> was find in 42.5% of analyzed samples. To the HPLC's method, the detection limits watched was 0.0085 µg/l and quantify method was 0.01 µg/l. The recuperation varied between 82% – 100% and coefficients of variation was lower than 14.6%. AFM<sub>1</sub> was find in 57.5% of samples analyzed. The t test of Student showed that the results taken by TLC, at level of 5% of significance. All the samples are inside maximum limit permitted in Brazil, by RDC Resolution nº 274, 2002, October, 15, that's 0.5 µg/l, and just 20% (HPLC) and 25% (TLC) had been above 0.05 µg/l of AFM<sub>1</sub>, tolerance required by some European Countries. The results found to AFM<sub>1</sub>, in pasteurized milk, C sort commercialized in Paraná State shown low level of contamination. However, there is a necessity of observing for a longer period, including all the seasons of year, to confirm its tendency.

KEY WORDS: aflatoxin M<sub>1</sub>, milk, TLC, HPLC, immunoaffinity column, mycotoxins.



# 1. INTRODUÇÃO

---

As aflatoxinas (AFs) são produzidas por três espécies de *Aspergillus* – *A. flavus*, *A. parasiticus* e, raramente, *A. nomius* – as quais contaminam plantas e seus produtos. *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxina B, enquanto as outras duas espécies produzem as aflatoxinas B e G. As principais aflatoxinas de interesse são designadas de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Estas toxinas são geralmente encontradas juntas em muitos alimentos e rações em várias proporções. Aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> são metabólitos hidroxilado das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente, produzidas por animais e geralmente é excretado no leite, urina de gado leiteiro e outras espécies de mamíferos que consumiram comida ou ração contaminados por essas aflatoxinas (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996; BAKIRCI, 2001; CREPPY, 2002).

Leite e produtos lácteos são os principais nutrientes para os seres humanos, especialmente crianças. Entretanto, ao mesmo tempo, estes produtos podem estar contaminados com aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), um perigo para a saúde humana. Por esta razão, muitos países possuem regulamento para controlar os níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em rações e propõem níveis máximos permissíveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite para reduzir os riscos (RASTOGI *et al.*, 2004).

As aflatoxinas são compostos severamente tóxicos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. O principal órgão atingido pela toxicidade e carcinogenicidade é o fígado (AYCICEK; AKSOY; SAYGI, 2005).

Aflatoxina M<sub>1</sub> possui alta atividade genotóxica, embora seja aproximadamente 10 vezes menos carcinogênica que AFB<sub>1</sub>. Segundo IARC (1993), a aflatoxina B<sub>1</sub> está classificada como grupo 1, carcinogênica para humanos, e a aflatoxina M<sub>1</sub> como grupo 2B, possivelmente carcinogênica para humanos, tendo a Organização Mundial de Saúde recomendado a redução dos níveis de AFM<sub>1</sub> ao mínimo, de modo a minimizar o risco potencial, desde que não há suficiente informação para estabelecer um nível de exposição razoável.

Os métodos para a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite utilizam, em sua maioria, extração com solventes orgânicos e purificação cromatográfica em fase sólida ou imunoafinidade (MARKAKI; MELISSARI, 1997; DRAGACCI; GROSSO;

GILBERT, 2001). Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constituem técnicas adequadas para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em extratos de leite (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

Uma vez que a pasteurização ou processamento não destrói a AFM<sub>1</sub> e o consumo de leite principalmente pela população infantil é muito significativo, por ser um nutriente primário, é prudente que se verifique a incidência de AFM<sub>1</sub> nesse alimento (PURCHASE, 1972). Deve-se ressaltar que estes produtos são consumidos largamente por crianças, que são consideradas mais susceptíveis aos efeitos adversos das micotoxinas (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO, 1996).

É importante verificar os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado ‘tipo C’ comercializado no Estado do Paraná, contribuindo cientificamente para alertar as indústrias de laticínios, considerando os riscos decorrentes do consumo de leite contaminado por AFM<sub>1</sub>, principalmente pela população infantil, além da importância do conhecimento de seus níveis de contaminação, em consequência de seu potencial hepatotóxico, teratogênico e carcinogênico, podendo assim proporcionar melhor qualidade de vida aos seus consumidores.

## 1.1 – OBJETIVOS

### 1.1.1 – Objetivo Geral

Determinar os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite pasteurizado ‘tipo C’ comercializado no Estado do Paraná por dois métodos analíticos diferentes, CCD e CLAE, utilizando coluna de imunoafinidade.

### 1.1.2 – Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado tipo C pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
  - Determinar o limite de detecção do método;
  - Determinar o limite de quantificação do método;
- Identificar e quantificar os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado tipo C pelo método de cromatografia em camada delgada;
  - Determinar o limite de detecção do método;
  - Determinar o limite de quantificação do método;
- Determinar e comparar, de acordo com os dois métodos, os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado tipo C;
- Comparar a eficiência dos métodos analíticos para análise de leite pasteurizado, CCD e CLAE, utilizando coluna de imunoafinidade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 – MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, ocorrendo em diferentes regiões do mundo e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais quando presentes nos alimentos e rações (NORDIN; LUCHESE, 1998).

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e “toxicum” que significa veneno ou toxina. Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001).

As micotoxicoses podem ocorrer, tanto em países industrializados como em desenvolvimento, e elevar-se quando combinada com as condições ambientais, sociais e econômicas e com condições meteorológicas (umidade, temperatura), favorecendo o crescimento de fungos (AYCICEK; AKSOY; SAYGI, 2005).

Mais de quatrocentas micotoxinas, conhecidas na atualidade, são produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos: as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (DILKIN, 2002).

As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas, produzidas por fungos, diferenciando-se das toxinas bacterianas por não terem natureza protéica nem serem imunogênicas. Os problemas provocados pelas micotoxinas são muito antigos. Nas dez pragas do Egito, há evidências da presença de tais substâncias nos alimentos (CIB, 2005).

Além de diversos efeitos tóxicos agudos, estas toxinas podem acarretar problemas crônicos graves como imunossupressão e carcinogenicidade. Ainda que o fungo possa ser inativado ou retirado durante o processamento e não estar presente no produto manufaturado, as toxinas podem permanecer viáveis, pois não são facilmente degradáveis (NUNES *et al.*, 2003).

Para JACOBSEN *et al.* (2005), micotoxicoses são intoxicações resultantes da ingestão de alimentos contendo metabólitos tóxicos, as micotoxinas, sendo que os episódios mais conhecidos são:

- intoxicação por aflatoxinas, que foi primeiramente reconhecida em 1960, na Inglaterra, devido à mortalidade de mais de 100 mil perus, outros 20 mil patos, faisões e perdizes por uma enfermidade chamada de “Doença X dos Perus”. Os exames revelaram que o agente causador era uma toxina presente na ração à base de farinha de amendoim proveniente do Brasil;
- envenenamento por ergot, associado à ingestão de farinha de centeio contaminada por *Claviceps purpurea*, patologia chamada de Fogo de Santo Antônio, que acometeu a população de países da Europa. Leva o nome desse santo devido ao fato de a intoxicação produzir uma gangrena periférica, resultando no aparecimento de sintomas semelhantes aos de uma queimadura;
- beribéri cardíaco ou doença do arroz amarelado, associado à ingestão de arroz mofado (toxina amarela do arroz). Está relacionada à intoxicação por citroviridina, metabólito do *Penicillium citreonigrum*;
- aleucia tóxica alimentar, associada ao mofo de *Fusarium* no trigo, painço e cevada, cujas manifestações são inflamações das mucosas e gastroenterite aguda, podendo evoluir para uma síndrome hemorrágica genital e sintomas neurológicos. Os responsáveis foram os tricotecenos, micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium*. Nos anos de 1941 a 1945, a aleucia tóxica alimentar fez um grande número de enfermos, tendo matado mais de 100 mil russos.

Mais recentemente, nos períodos de 1957 e 1968, a nefropatia dos Bálcãs, que atingiu vários países do Leste Europeu, foi causada pela ingestão de alimentos que continham a ocratoxina A (CIB, 2005).

Ainda hoje, enormes prejuízos econômicos decorrem da utilização de produtos contaminados com essas substâncias tóxicas. Quando não provocam a morte de aves em processos de intoxicação aguda, as micotoxinas determinam

diminuição de peso e da postura, aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias e problemas reprodutivos, entre outros. Tais consequências são mais acentuadas nos países de clima tropical úmido, que reúnem condições adequadas para o desenvolvimento de fungos (CIB, 2005).

As micotoxinas são produtos tóxicos formados por diversas espécies de fungos que colonizam as plantas no campo ou depois da colheita. Nas fazendas os animais contaminados por micotoxinas provocam grandes perdas econômicas por recusar alimento, baixa conversão alimentícia, diminuição do ganho de peso corporal, imunossupressão, interferência com a fertilidade e resíduos em produtos animais. Apesar de terem alguns efeitos, suas estruturas divergem bastante, tendo em comum apenas o fato de serem produzidas por fungos.

A presença de uma micotoxina e o perigo associado somente pode ser determinada depois da extração e identificação da mesma por quatro razões: a presença do fungo não garante que existe uma micotoxina, a micotoxina continua no alimento mesmo que o fungo tenha desaparecido, um fungo pode produzir mais de uma micotoxina, uma determinada micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo (CARRILLO, 2005).

Diante disto, as micotoxinas produzidas durante a esporulação dos fungos contaminam os animais que consomem alimentos contaminados, e desta forma são transferidas para os seus produtos, tal como o leite ou a carne e, conseqüentemente, prejudicando a saúde humana (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001).

### 2.1.1 – Fungos Produtores de Micotoxinas

As principais micotoxinas encontradas nas forragens e grãos estão geralmente associadas com um grupo de espécies de fungos, como: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Claviceps* (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001).

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, além de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. A formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências

que o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento na hierarquia da regulação. Quando um meio de cultura é rico, com nutrientes balanceados, microrganismos tipo selvagem não realizam o metabolismo secundário ou seu potencial é reduzido. A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença de micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorre (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001).

Os fungos crescem e se proliferam bem em cereais, principalmente, no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo e arroz, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento dos grãos. Por isso, a redução da umidade dos cereais através da secagem é de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (DILKIN, 2002).

Segundo SCUSSEL (1998), os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas são classificados em três categorias: fatores físicos, químicos e biológicos, como: umidade relativa, conteúdo de umidade, temperatura, luz, danos mecânicos, microclima (atmosfera), fungicidas, composição do substrato, competição microbiológica (interação microbiana) e linhagem do fungo contaminante. Os mais importantes dentre eles, que levam à formação dos fungos são:

- Umidade Relativa (UR): é a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o produto. A UR mínima onde fungos crescem é de 70%; e a UR ótima é de 80% – 85%, contudo eles também podem crescer a UR de 90% – 100%. As condições que favorecem uma umidade relativa elevada com conseqüente proliferação de fungos são: clima chuvoso, deixando secar o alimento no campo: ocorre absorção de umidade; colheita de grãos com umidade elevada e estocados com pouca ventilação; grãos secos estocados com boa ventilação, porém, em tempo chuvoso (principalmente quando há elevada proporção de grãos quebrados); embalagem permeável ou alterada por insetos ou roedores.
- Conteúdo de Umidade: o teor de umidade é usualmente expresso em termos de umidade absoluta do material ou conteúdo de umidade. As condições que

favorecem o conteúdo de umidade heterogêneo são: produto estocado com alto conteúdo de umidade, resultante da secagem ineficiente do produto; presença de umidade secundária, devido à precipitação ou absorção dos vapores de água; difusão do calor e umidade de alguns grãos e sementes não completamente secos (com conseqüente atividade respiratória dos grãos) causado por gradiente de temperatura; atividade vital dos microrganismos, aumentando a temperatura e o conteúdo de umidade em grãos e sementes não completamente secos. Portanto, para que os grãos tenham estocagem segura deve-se, se possível, realizar uma secagem homogênea; evitar muita quebra de grãos durante a colheita, secagem e estocagem; manter o ambiente de estocagem sem roedores; manter o grão em ambiente bem ventilado e secar abaixo da umidade crítica.

- Temperatura: é menos restrita quanto à umidade no que diz respeito ao crescimento fúngico e produção de toxina. Para várias espécies de fungos, a temperatura de 30°C em regiões tropicais é temperatura ambiente e eles crescem muito bem. Porém, a temperatura pode ser afetada por outros fatores, tais como umidade, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes.
- Competição Microbiológica: a existência de amendoim atóxico, apesar de estar altamente contaminado por fungos, bem como a queda abrupta da quantidade após a produção máxima, levaram a pensar na existência de microrganismos resistentes à toxina e aptos a inibir sua produção ou degradá-la.
- Linhagem do Fungo Contaminante: existem linhagens de fungos mais produtoras que irão depender, também, da temperatura, substrato, umidade e microrganismos capazes de degradar a toxina. Portanto, os fatores que influenciam o crescimento dos fungos não atuam sozinhos, mas em conjunto: quantidade de inóculo, temperatura, umidade do substrato, condições físicas do substrato, crescimento de outros fungos e umidade do ambiente.

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são freqüentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, como aqueles que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos



ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90% – 100% para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (ATUI; LAZZARI, 1998).

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos, causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (ATUI; LAZZARI, 1998).

*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, espécies mais importantes produtoras de aflatoxina, são saprófitas naturais do solo e ar, e em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A ocorrência e magnitude da contaminação por essas micotoxinas variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. As culturas em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil estão mais sujeitas à contaminação, pois as melhores condições para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com alta temperatura (25 a 30°C) e umidade elevada (80% a 90%) (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984).

A contaminação dos produtos agrícolas ocorre através do contato com os esporos do fungo presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação, bem como o transporte inadequado favorecem não apenas a

contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados (CHU, 1991).

Perdas econômicas associadas ao descarte do alimento ou ração, altamente contaminado, são facilmente detectadas quando se mantém controle e levantamentos representativos são realizados. A perda econômica total é a somatória de vários fatores e compreende perdas diretas de produtos agrícolas, perdas de animais acompanhada de diversas taxas de mortalidade, doenças em humanos, diminuição da produtividade, animais com redução na velocidade de crescimento e produtividade, custos indiretos de sistemas de controle, custos de remoção da toxina para recuperar produtos rejeitados e rejeição de produtos pelo mercado importador (SCUSSEL, 1998).

## 2.1.2 – Principais Micotoxinas

### 2.1.2.1 – Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários de fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* – dos quais contaminam plantas e seus produtos. Cerca de 50% das espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus* são produtores de AFs. Somente quatro foram identificadas como contaminantes naturais de produtos agrícolas. São denominadas aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>); B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>); G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>); G<sub>2</sub>, (AFG<sub>2</sub>). A AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente (DILKIN *et al.*, 2000; CREPPY, 2002).

Aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> são metabólitos hidroxilado das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e podem ser encontrados em produtos lácteos obtidos de animais que ingeriram ração contaminada. As principais fontes de aflatoxinas em rações são amendoim, farinha de milho e farinha do caroço de algodão (CREPPY, 2002).

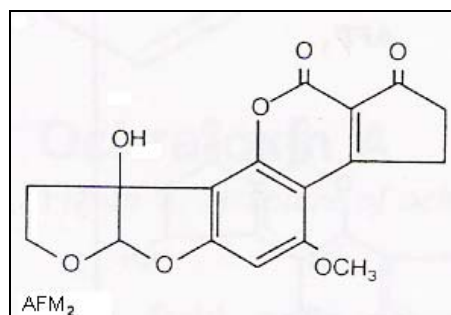
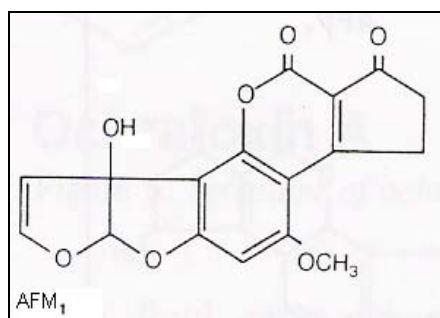
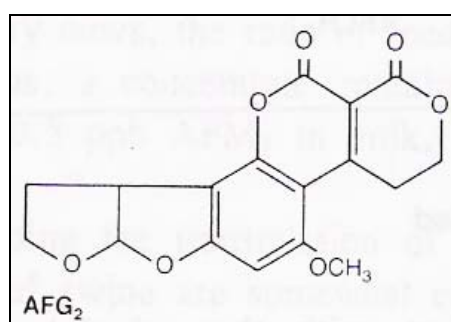
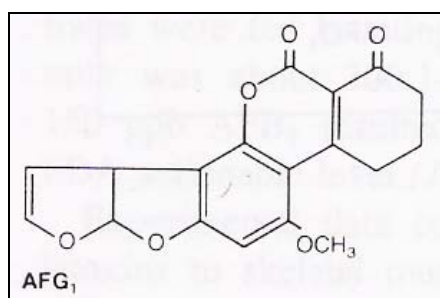
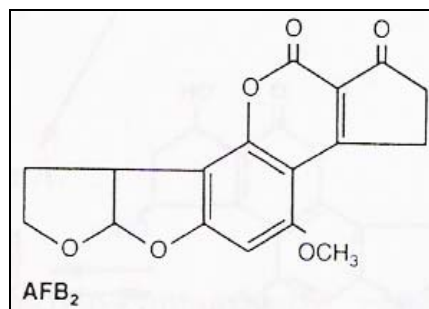
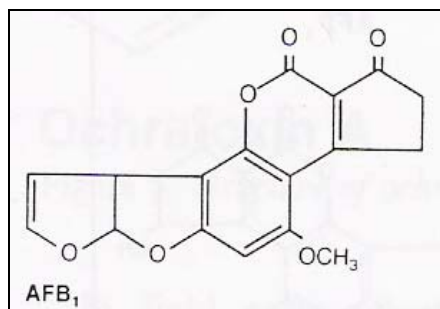
Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas

(SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996) e imunossupressoras (NORDIN; LUCHESE, 1998). Estes efeitos sofrem influência do estado nutricional, sexo, idade, exposição a outros agentes químicos, dose e período de exposição à toxina, espécie, frequência e composição da dieta (AMADO, 1999).

As aflatoxinas receberam essas denominações, B e G, devido suas características fluorescentes, 'Blue' (azul) e 'Green' (verde), quando expostas à luz ultravioleta. A designação 'M' origina-se de 'milk toxin' por ser uma toxina excretada no leite.

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam um grupo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados; sua estrutura consiste de um núcleo cumarínico fundido com um anel bifurano e mais um anel pentanona ou 6-lactona. As aflatoxinas B e M apresentam o anel pentanona, enquanto as aflatoxinas G possuem o anel 6-lactona (APPLEBAUM *et al.*, 1982). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas.

FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS AFLATOXINAS



FONTE: BIEHL; BUCK, 1987

O fígado é o órgão alvo para esses compostos, sendo que em diversos casos de morte causados pela destruição desse foram identificadas aflatoxinas no mesmo. Além de induzir o câncer no fígado, as AFs podem ocasionar outros efeitos como cirrose hepática, diminuição da resistência imunológica propiciando surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito, coma, etc (MALLMANN *et al.*, 2003).

Em estado puro, as aflatoxinas são extremamente estáveis em altas temperaturas superando até 200°C e não são afetadas pelo frio. São relativamente instáveis, quando expostas à luz, e particularmente à radiação ultravioleta (UV), ao ar sobre placa de cromatografia de camada delgada (CCD) e ainda quando dissolvidas em solventes altamente polares. São solúveis em solventes como clorofórmio, benzeno, metanol e etanol, mas insolúveis em gorduras e óleos. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

Agentes oxidantes, como água oxigenada e hipoclorito de sódio, reduzem o teor de aflatoxinas no alimento, mas a utilização de tais soluções é impraticável, uma vez que ocorre, além da destruição de nutrientes, “flavor”, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

Em cereais estocados, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e a produção de AFs são a umidade relativa do ar e do substrato e temperatura de armazenamento. Umidade relativa de 80% a 85% com 17% de umidade dos cereais e temperatura de 24 a 35°C são condições ótimas para a produção de aflatoxinas. O crescimento fúngico dificilmente ocorre em cereais que apresentam umidade inferior a 12%. Em rações, ótimas condições para a produção de AFs foram encontradas com umidade de 10% a 13% do substrato, 79% a 89% de umidade relativa do ar e temperaturas de 19 a 27°C (DILKIN *et al.*, 2000).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde, Resolução 274, de 15 de outubro de 2002, estabelece limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho (BRASIL, 2002a) (Tabela 1).

TABELA 1 – LIMITES MÁXIMOS ADMISSÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS EM LEITE, AMENDOIM E MILHO

ALIMENTO	AFLATOXINA	LIMITE MÁXIMO
Leite fluído; Leite em pó	M <sub>1</sub>	0,5 µg/L; 5,0 µg/kg
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído); Farinhas ou sêmolas de milho	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	20,0 µg/kg
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado); Pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	20,0 µg/kg

FONTE: BRASIL, 2002a

As aflatoxinas podem ser encontradas em praticamente todos os alimentos de consumo humano e animal. A aflatoxicose tem causado preocupação pública, devido aos efeitos provocados pelas rações contaminadas sobre a saúde das aves e à possibilidade de transmissão de resíduos tóxicos para a carne, o leite e os ovos, resultando num potente risco à saúde humana. Animais domésticos como bovinos, suínos, perus, galinhas e patos que consomem doses subletais de aflatoxinas por vários dias desenvolvem uma síndrome tóxica, sendo o fígado o órgão mais lesado. A dose limiar para o aumento do fígado é menor do que aquela utilizada para outros órgãos testados. Isso indica que o fígado é o órgão mais suscetível a aflatoxinas, concordando com o fato de que elas são sabidamente hepatocarcinogênicas (SALLE *et al.*, 2001).

Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> apresentam grande risco pela ampla contaminação de variedades de “commodities” da agricultura e de gêneros alimentícios, especialmente aqueles contendo alto teor de carboidratos e/ou gorduras, tais como nozes e seus produtos, amendoim, milho, cereais, trigo, óleo de grãos, figo e uva-passas secos, semente de algodão, leite e condimentos (NILÜFER; BOYACIOGLU, 2002).

Baseado apenas na sintomatologia, o diagnóstico da aflatoxicose tem sido incompleto. Ele depende da ausência de outras doenças e do achado de aflatoxina no alimento suspeito. Uma dificuldade geralmente encontrada na análise da ração é

que o alimento que causou o problema já foi consumido e o que está disponível para teste poderá ter resultado negativo (SALLE *et al.*, 2001).

CARVALHO (1995) classifica a aflatoxicose em três formas clínicas distintas:

- doença aguda primária, com manifestação que varia de acordo com a sensibilidade, geralmente após consumo de quantidades moderadas a altas de AFB<sub>1</sub>, com as lesões sendo observadas especialmente no fígado, sistema nervoso central e rins;
- doença crônica primária, após consumo de quantidades moderadas a baixas de AFB<sub>1</sub>, incapazes de levar aos quadros clínicos clássicos – relata-se um prejuízo insidioso da saúde e da reprodução, levando ao retardo no crescimento, perda da qualidade da carcaça e redução da produção de leite;
- doença crônica secundária, resultante da ação da ingestão de quantidade reduzida de aflatoxina, incapaz de causar intoxicação evidente, mas capaz de predispor o hospedeiro a doenças infecciosas por imunodepressão, ocorrendo sinais de doenças para as quais o hospedeiro estava predisposto.

#### 2.1.2.2 – Ocratoxinas

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de fungos das espécies *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente *A. ochraceus* e *P. viridicatum*, os quais são encontrados no mundo todo. É um contaminante natural da alimentação humana e animal, presente em altos níveis nos grãos, cereais e cafés. OTA tem sido encontrada em vários alimentos: cereais, trigo, feijão, nozes, café, frutas secas, sucos de frutas e vinhos. É também encontrada em carnes de porco e de aves domésticas, peixe de qualidade inferior e leite (ABOUZIED *et al.*, 2002).

A ocratoxina A é classificada pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993) como substância do grupo 2B devido sua carcinogenicidade. Animais em estudos mostraram que a toxina é uma potente nefrotoxina, imunossupressora e teratogênica (CHIAVARO *et al.*, 2002).

A alteração da filtração glomerular e prejuízos na função dos túbulos contornados proximais são os principais prejuízos da intoxicação por ocratoxina A,

levando a perda da capacidade de concentração urinária. A ocratoxicose em suínos traduz-se por uma intoxicação que cursa com diminuição do ganho de peso, sinais clínicos caracterizados por polidipsia e poliúria, além de lesões renais. Doses de 200 µg/kg de OTA na ração foram suficientes para que os animais apresentassem nefropatias, levando a reflexos negativos sobre a conversão alimentar e o ganho de peso. A mortalidade pode chegar 90% nos lotes afetados (DILKIN, 2002).

Espécies fúngicas produtoras de ocratoxina A podem colonizar grande variedade de alimentos e ser a origem de sua contaminação por esta micotoxina. O crescimento fúngico nos alimentos não significa necessariamente a presença da micotoxina, pois sua produção é influenciada por diversos fatores como a umidade, a temperatura, o pH e a composição do alimento, entre outros, e, além disso, estas condições são diferentes para cada espécie produtora (ARBILLAGA *et al.*, 2004).

A Food and Agriculture Organization (FAO) / World Health Organization (WHO) Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceu uma quantidade provisória semanal tolerável (PTWI – Provisional Tolerable Weekly Intake) de 100 ng kg<sup>-1</sup> de peso corporal (body weight – bw), baseada na soma mais baixa de toxina que causou efeitos adversos em rins suínos. Foi estimada uma baixa quantidade diária tolerável de 4,2 ng kg<sup>-1</sup> bw dia<sup>-1</sup> para seres humanos (SANTOS; VARGAS, 2002).

A Comunidade Européia (EC) proíbe a venda de gêneros alimentícios com excesso de contaminantes conforme o ponto de vista da saúde pública, e em particular do nível toxicológico. Na Europa, o Comitê Científico para Alimentos da Comunidade Européia, considerou a ocratoxina um contaminante e agente nefrotóxico. E no caso de produtos de café, estados membros da EC como o Reino Unido e a Alemanha estão tentando avaliar a presença de OTA, enquanto que outros estados já introduziram limites nacionais em café verde (Itália, 8 µg/kg; Finlândia, 10 µg/kg; Grécia, 20 µg/kg) ou produtos do café (Switzerland, 5 µg/kg) (BUCHELI; TANIWAKI, 2002).

Segundo CALDAS; SILVA; OLIVEIRA (2002), a Ocratoxina A tem sido relatada em até 50% das amostras de milho, trigo, arroz e feijão analisadas em vários estados do Brasil. Apesar de a legislação brasileira não prever níveis máximos dessa micotoxina em alimentos, são necessários programas de



monitoramento para subsidiar estudos de exposição humana e avaliar a necessidade de estabelecer esses níveis.

#### 2.1.2.3 – Fumonisinias

As fumonisinias são micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides*. Porém, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nigram*, *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium polyphialidicum* e *Fusarium oxysporum* (POZZI et al., 2002).

As espécies do gênero *Fusarium* são as principais invasoras de grãos de milho no campo, causando inclusive várias doenças, como a podridão de sementes e colmo. Estas espécies que invadem a planta no campo, também podem ser encontradas no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade sejam adequadas. O *Fusarium verticillioides* é o fungo mais freqüente em grãos de milho recém colhidos, com níveis de contaminação de até 100%, sendo sua toxina detectada em vários países (Canadá, Egito, Peru, África do Sul, EUA). No Brasil, algumas espécies do gênero *Fusarium* já foram isoladas do milho e outros substratos procedentes de vários estados brasileiros, com predominância do *Fusarium verticillioides* (DILKIN, 2002; POZZI et al., 2002).

As fumonisinias isoladas e caracterizadas são divididas em 16 tipos: Fumonisina B1 (FB1), FB2, FB3, FB4, A1, A2, A3, AK1, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1A e PH1B. As fumonisinias chamadas de FB1 e FB2 foram isoladas de cepas *F. verticillioides* causadora de leucoencefalomalácia eqüina (POZZI et al., 2002).

Dentre as fumonisinias identificadas, as FB1, FB2 e FB3 são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a FB1 é quase sempre a mais abundante, representando cerca de 70% da concentração total de fumonisinias detectadas. As fumonisinias B2 e B3 ocorrem em menores concentrações (DILKIN, 2002).

Estas micotoxinas causam leucoencefalomalácia em eqüinos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade em ratos, provável câncer de esôfago em humanos e leucoencefalomalácia em coelhos.

Os níveis de FB1 detectados em alimentos associados à ocorrência de leucoencefalomalácia em eqüinos na África do Sul e Estados Unidos chegaram a 8850 e 7700 ng/g, respectivamente (POZZI *et al.*, 2002).

A leucoencefalomalácia eqüina (LEME) é uma doença não infecciosa esporádica e altamente fatal que afeta o SNC de cavalos e outros eqüídeos, caracterizada por encefalite hemorrágica aguda (DILKIN, 2002).

Os suínos apresentam alta sensibilidade às fumonisinas, suportando apenas concentrações inferiores a 10 mg/kg de alimento. Nos suínos, os principais órgãos alvo são o pulmão, fígado e coração, sendo que a síndrome específica nessa espécie é o edema pulmonar suíno, geralmente com hidrotórax. Tal alteração é decorrente da ingestão de altas doses da micotoxina por curtos períodos. Os maiores prejuízos são decorrentes da ingestão de doses baixas da toxina, que induzem lesões hepáticas e lesões hiperplásicas na mucosa esofágica em suínos desmamados (DILKIN, 2002).

Como em outras espécies animais, as fumonisinas alteram a biossíntese dos esfingolipídeos, com as maiores alterações nas concentrações das bases esfingóides no rim, fígado, pulmão e coração. O sistema imune específico não é afetado, entretanto FB1 inibiu a fagocitose e a biossíntese de esfingolipídeos nos macrófagos pulmonares, induzindo um acúmulo de material membranoso nas células endoteliais dos capilares pulmonares. Essa alteração parece ser específica a esse tipo de célula e à espécie suína (DILKIN, 2002).

Os bovinos parecem ser menos susceptíveis aos efeitos adversos de FB1. Avaliaram-se os efeitos da administração de material de cultura de *F. verticillioides* incorporado à dieta de 18 bezerros. Os alimentos continham 15, 31, 148 mg de FB1/kg e foram administrados durante o período de 30 dias. Não foram observadas alterações no desempenho dos animais e houve apenas alterações das enzimas hepáticas (AST, GGT e lactato desidrogenase). O fornecimento aos bezerros, de dietas com níveis de FB1 considerados tóxicos a eqüinos e suínos, não causou alterações significativas nestes animais (DILKIN, 2002).

#### 2.1.2.4 – Zearalenona

A zearalenona, metabólito secundário com característica estrogênica, ocorre em praticamente todos os cereais, especialmente em culturas de inverno, contaminadas por fungos do gênero *Fusarium*. A contaminação natural aparece em cevada, milho, sorgo, aveia e rações produzidas com base nestes produtos (DILKIN, 2002).

A ação desta micotoxina se dá pelo estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, incrementando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Conseqüentemente, a secreção das células endometriais, síntese das proteínas uterinas e o peso do trato reprodutivo são aumentados. Estas alterações podem levar à pseudogestação pela manutenção do corpo lúteo, levando a quadros caracterizados por vulvovaginite, leitões fracos e natimortos. Também pode observar-se uma marcada redução nas taxas de concepção, acompanhada de repetição de cio. A intoxicação mimetiza o estro e os leitões recém-nascidos poderão apresentar os sinais clínicos, caracterizados como vulvovaginite infantil (DILKIN, 2002).

Quantidades insignificantes de resíduos de zearalenona e seus metabólitos são passados ao leite de ruminantes e aos ovos, porém em músculos de ovinos que pastam em campo a contaminação alcançou até 500 ng/kg e em bile chegou a apresentar 3 µg/mL. A ingestão diária média da zearalenona proveniente de cereais foi estabelecida pela Europa em 1,5 µg/dia e de 3,5 µg/dia para o Oriente Médio. A ingestão diária máxima tolerável foi estabelecida em 0,5 µg/kg de peso corporal (CARRILLO, 2004).

Em machos jovens, a toxina causa feminização, incluindo edema de prepúcio, atrofia testicular e aumento da glândula mamária, porém estas alterações, aparentemente, não levam a efeitos sobre a capacidade reprodutiva, quando adulto. Em cachaaos, a redução da libido, bem como uma discreta redução sobre a qualidade espermática pode ser observada (DILKIN, 2002).

#### 2.1.2.5 – Tricotecenos

Os tricotecenos (TCT) formam um grupo químico de metabólitos fúngicos, com a mesma estrutura básica, produzida principalmente por fungos do gênero *Fusarium* como *F. graminearum* e *F. tricinctum*. Mais que uma centena de TCT são conhecidos. De acordo com a estrutura molecular, são divididos em dois grandes grupos: os de cadeia simples e os macrocíclicos. Apenas algumas apresentam importância econômica no Brasil, sendo o deoxinivalenol (vomitoxina ou DON) e a toxina T-2 os principais representantes (DILKIN, 2002).

A ocorrência de tricotecenos é significativa em culturas de inverno, como trigo, cevada, aveia, arroz e centeio, cultivadas em baixas temperaturas, variando entre 6 e 24°C. As concentrações de deoxinivalenol (DON) freqüentemente limita-se entre 0,1 a 41,6 mg/kg com média de 2,4 até 4 mg/kg. Níveis de contaminação natural de DON, T-2 e NIV (nivalenol) geralmente alcançam até 10 mg/kg, com poucas exceções mostrando níveis de 15-40 mg/kg. Mundialmente, DON é o contaminante de cereais mais comum, acompanhado em certas regiões por nivalenol (NIV). Poderá haver a presença concomitante de outros TCT e outras toxinas de *Fusarium* no mesmo lote de cereais (DILKIN, 2002).

Suínos e outros monogástricos apresentam a maior sensibilidade aos tricotecenos, seguidos pelas aves. O NIV e DON induzem recusa de alimentos e perda de peso, apresentam toxicidades similares e um nível combinado menor que 0,4 mg/kg é aceitável (para suínos, os quais são relativamente susceptíveis), enquanto mais de 2,0 mg/kg é sempre inaceitável (DILKIN, 2002).

Os TCT atuam inibindo a enzima peptiltransferase, desta forma diminuindo a síntese protéica, o que afeta principalmente células em divisão ativa, como as do trato gastrointestinal, pele e células linfóides, eritróides e órgãos vitais. Os tricotecenos são imunossupressores e também são associados a hemorragias, sendo que o tempo da protrombina é aumentado significativamente, porém o fator primário da hemorragia é pela diminuição do fator VII da coagulação sangüínea. As intoxicações por TCT acarretam recusa de alimentos, vômito, redução na conversão alimentar e diarréia (DILKIN, 2002).

A síndrome sanguinolenta, produzida pela toxina T-2, se caracteriza pela ocorrência de dermatites, abortamentos, distúrbios nervosos, hemorragias gástricas

e viscerais. Todos os TCT podem ser agudamente letais. Porém os maiores problemas tendem a ser as toxicoses subagudas chegando a cronicidade, as quais levam a efeitos inespecíficos associados ao mau desempenho. Lesões macroscópicas após a necropsia nem sempre são evidentes, embora um aumento do volume do fígado, hemorragia em linfonodos e erosões no estômago e intestinos possam ser observados (DILKIN, 2002).

## 2.2 – AFLATOXINAS E CARCINOGENICIDADE

As aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüentemente a ingestão de alimentos contaminados (IARC, 1993). Existem evidências de que outras doenças, como a síndrome de Reye e o Kwashiorkor, também estejam associadas às aflatoxinas (HENDRICKSE, 1991).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer, apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e Ilhas do Pacífico (PARKIN; STJERNSWARD; MUIR, 1984). A ocorrência do carcinoma hepatocelular é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30-50 anos. Entre os países com maior incidências estão Moçambique, Zimbabwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan. Os países com incidência intermediária incluem Swazilândia, Transkei, Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (KEEHN; FRANK-STROMBORG, 1991).

As diferenças observadas na incidência do carcinoma hepatocelular entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HARRIS, 1991). Diversos autores têm reportado a presença de aflatoxinas no soro e em biópsia de fígado de pacientes com câncer hepático (COULTER *et al.*, 1986; OLUBUYIDE, 1992). Entretanto, experiências diretas não podem ser feitas, as evidências aparecem então em dados indiretos, ou seja, por experiências realizadas em animais, por possíveis casos de aflatoxicose no homem e através de estudos epidemiológicos efetuados em áreas geográficas, onde

a contaminação de alimentos por aflatoxinas e o carcinoma hepatocelular são freqüentes (BRUCE, 1990; MCLEAN; DUTTON, 1995; SCUSSEL, 1998).

Investigações epidemiológicas e de laboratório estabeleceram uma associação entre hepatite B crônica e carcinoma hepatocelular. A relação entre essas duas enfermidades é argumentada pela presença do DNA viral em células hepáticas tumorais, sendo 300 vezes superior o risco de desenvolver hepatocarcinoma em portador crônico do vírus da hepatite B (HBV). Estudos epidemiológicos realizados na Ásia e África têm associado a incidência de câncer primário do fígado com o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas (GROOPMAN *et al.* citados por BAÑUELOS *et al.* 2000).

Ainda segundo BAÑUELOS *et al.* (2000), os resultados encontrados em um estudo realizado no México são interessantes e significativos quanto à relação entre o vírus da hepatite e a aflatoxina, uma vez que a alimentação básica dos mexicanos é milho e arroz que são alimentos muito suscetíveis à contaminação por esta micotoxina.

De acordo com STOLOFF (1987), a comprovação científica do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático, no homem, é dificultada pelo fato de que, em sua grande maioria, os estudos epidemiológicos foram realizados em áreas onde a infecção pelo vírus da hepatite B é endêmica e, também, correlacionada à incidência do carcinoma hepatocelular. A dose média para a produção de tumores (DT50) no homem é igual a 132 mg/kg/dia. Este valor está próximo da DT50 observada em algumas espécies de primatas, porém é consideravelmente superior às das espécies de roedores mais sensíveis. Entretanto, deve-se ressaltar que a DT50 para o homem é teórica, uma vez que, para seu cálculo, foram assumidas várias condições, entre elas, a de que a aflatoxina B<sub>1</sub> seja a única causa do carcinoma hepatocelular e que a exposição a este carcinógeno tenha ocorrido continuamente durante cerca de 50 anos da vida do indivíduo (WOGAN, 1992).

A capacidade da AFB<sub>1</sub> produzir mutações é conhecida pela habilidade de um metabólito ativo unir-se covalentemente à guanina do DNA na posição N-7 (aduto) e esta reação pode ser importante no início do câncer (WANG; GROOPMAN, 1999). GROOPMAN; CAIN; KENSLER (1988) concluíram que, no homem, cerca de 1% - 2% da AFB<sub>1</sub> ingerida liga-se covalentemente à albumina plasmática, e que a

dosagem destes adutos evidencia a exposição à AFB<sub>1</sub> ao longo de aproximadamente 20 dias.

Estudos experimentais demonstraram que a formação de adutos AFB<sub>1</sub>-DNA é diretamente proporcional à dose de AFB<sub>1</sub> ingerida e à indução de tumores hepáticos em animais expostos (CHOY, 1993). Segundo STERN (2001), existe uma alta correlação entre a ingestão total de AFB<sub>1</sub> e a excreção urinária total de adutos AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina em seres humanos.

Os efeitos carcinogênicos são exercidos após sua ativação pelos microsomas hepáticos, com posterior ligação dos intermediários reativos ao DNA, determinando o bloqueio da transcrição e ocasionando uma proliferação celular anormal. As mutações determinadas pelas aflatoxinas representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno (ELLIS *et al.*, 1991).

A carcinogenicidade da AFB<sub>1</sub>, aflatoxicol (aflatoxina L), AFM<sub>1</sub> e aflatoxicol M<sub>1</sub> (aflatoxina LM<sub>1</sub>) foi comparada em termos de ligação no fígado ao DNA em truta arco-íris. Compostos triviais foram sintetizados, a curva dose-resposta para ligação ao DNA foi estabelecida, e o índice de ligação ao DNA no fígado foi calculado para as quatro aflatoxinas depois de duas semanas de dieta com ingestão das AFs em filhotes de trutas. O nível de aduto aumentou linearmente com a concentração da dieta, com índice relativo de ligação ao DNA de 21, 20, 2,4 e 2,2x10<sup>3</sup> (pmol/mg de DNA) / (pmol/g de dieta) para AFB<sub>1</sub>, AFL, AFM<sub>1</sub> e AFLM<sub>1</sub>, respectivamente (HENRY *et al.*, 2006).

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado (BUSBY *et al.*, 1984).

### 2.3 – AFLATOXINAS B<sub>1</sub> E M<sub>1</sub>

A ingestão de aflatoxinas pode levar a um quadro de intoxicação aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida. Seus efeitos toxicológicos somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas. A

aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser biotransformada no fígado de animais, incluindo o homem, em vários outros metabólitos tóxicos, tais como aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) que é excretada pelo leite, daí seu nome “milk toxin” (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A maioria dos países desenvolvidos regularizaram os níveis máximos permissíveis para AFM<sub>1</sub> em leite e seus derivados. Os limites são altamente variáveis, dependendo, assim, do grau de desenvolvimento e envolvimento econômico dos países. A Tabela 2 mostra os níveis de tolerância para AFM<sub>1</sub> em leite e produtos lácteos em vários países, inclusive o Brasil (KANIYOU-GRIGORIADOU *et al.*, 2005).

TABELA 2 – LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL PARA AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE E DERIVADOS DE LEITE PARA CONSUMO HUMANO

PAÍS	LEITE CRU (µg/kg)	DERIVADOS DE LEITE (µg/kg)
União Européia	0,05	0,05
Áustria	0,05; 0,01 (leite pasteurizado infantil)	0,02 (manteiga); 0,25 (queijo); 0,40 (leite em pó)
França	0,05; 0,03 (para crianças <3anos)	
Suíça	0,05	0,025 (soro de leite e produtos); 0,25 (queijo); 0,02 (manteiga); 0,10 (leite em pó)
Bulgária	0,50	
Romênia	0	
República Tcheca	0,50	
EUA		0,50
Brasil		0,50 (leite fluido); 5,0 (leite em pó)
Argentina	0,05	0,50 (produtos lácteos)
Honduras	0,05	0,25 (queijo)
Nigéria	1	
Egito	0	0
Turquia	0,05	0,25 (queijo)

FONTE: KANIYOU-GRIGORIADOU *et al.*, 2005

Aflatoxina B<sub>1</sub> é a toxina hepatocarcinogênica mais potente conhecida em mamíferos e sua avaliação de risco é muito bem estabelecido. O aspecto mais ameaçador da contaminação por AFB<sub>1</sub> está relacionado com a AFM<sub>1</sub>.



Aproximadamente 0,3% – 6,2% de AFB<sub>1</sub> em ração animal é transformada para AFM<sub>1</sub> em leite. Aflatoxina M<sub>1</sub> é produzida pelo metabolismo da AFB<sub>1</sub>. A toxicidade da AFM<sub>1</sub> é de magnitude menor que a AFB<sub>1</sub> (CREPPY, 2002). Muitas pesquisas relatam que existe uma relação linear entre a quantidade de AFM<sub>1</sub> no leite e a ração, contaminada por AFB<sub>1</sub>, consumida pelos mesmos animais (BAKIRCI, 2001). Para OLIVEIRA e GERMANO (1997), a imprecisão dos valores de conversão da AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub> reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados como fator imprescindível para o controle da ocorrência de AFM<sub>1</sub>.

A toxicidade aguda da AFM<sub>1</sub> é muito semelhante à da AFB<sub>1</sub>, manifestando seus efeitos tóxicos também em doses baixas. PURCHASE e STEYN (1967) observaram que os valores da dose letal média (DL<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> em patos de um dia foram de 0,24 e 0,32 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente.

NEAL *et al.* (1998), em estudo 'in vitro' com células de linhagem humana, propuseram que a elevada citotoxicidade da AFM<sub>1</sub> estaria relacionada ao fato da mesma não necessitar de ativação metabólica para se ligar às proteínas microssomais, diferentemente da AFB<sub>1</sub>.

A teratogênese provocada por determinadas concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> já foi observada em animais, através de alguns efeitos durante o curso da gravidez, principalmente durante a primeira fase embrionária (ELLIS, 1991). De acordo com SCUSSEL (1998), os efeitos teratogênicos das aflatoxinas causam má formação do feto e reabsorção de embriões.

A imunossupressão manifesta-se de diferentes formas, como diminuição dos linfócitos T ou B, supressão dos anticorpos ou retardamento na atividade dos macrófagos e neutrófilos, aumentando a susceptibilidade a determinadas infecções, podendo implicar na transmissão de patógenos ao homem. A dose diária mínima de aflatoxina B<sub>1</sub> que induz a imunossupressão através da hipoplasia do timo e da depleção dos timócitos é de 0,25 mg/kg de peso vivo (ELLIS, 1991).

A AFB<sub>1</sub> possui efeitos anticoagulantes em diversas espécies animais. É incolor, inodora, solúvel em solventes orgânicos (metanol e etanol), resistente ao calor, ao frio e à luz, não altera o sabor dos alimentos e é degradada somente pelo metabolismo hepático (BABABUNMI; THABREW; BASSIR, 1980).

Segundo FRAGA *et al.* (1996), a aflatoxina M<sub>1</sub> é um potente mutagênico e carcinogênico excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas

com aflatoxina B<sub>1</sub> e tem sido detectada em níveis significativos e de risco em produtos de origem animal como leite e subprodutos, carnes (suína, bovina e de aves), vísceras (fígado e rins) e em ovos.

No outono de 1977, no sudoeste dos Estados dos Unidos, ocorreu uma alta incidência de aflatoxina B<sub>1</sub> em milho e, conseqüentemente, foi detectada a presença de altos níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de vaca da região (STUBBLEFIELD, citado por SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1984). Este fato fez com que a Food and Drug Administration estabelecesse o limite de tolerância de 0,5 ppb de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite de vaca (SABINO; PURCHIO; ZORZETTO, 1984).

Embora a maioria das referências na literatura relatem dados sobre leite de vaca, é sabido que essa aflatoxina pode facilmente ocorrer em leite de ovelhas, cabras, búfala e camela (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996).

Cada país tem tentado definir regulamentações, sendo considerados aspectos relacionados à saúde pública, políticos e econômicos. A União Européia adotou o limite de tolerância máximo de 0,05 µg/L para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido (EUROPEAN COMMUNITIES, 1998). O regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas estipulou os níveis de 0,5 µg/L e 5 µg/kg para leite fluido e em pó, respectivamente, sendo estes os limites internalizados pelo Brasil (BRASIL, 1995).

A concentração de AFB<sub>1</sub> em ração pode ser reduzida pela boa prática de fabricação (BPF) e conservação. Se essas medidas preventivas forem insuficientes, a AFB<sub>1</sub> pode ser reduzida por tratamentos físico ou químico. O tratamento físico inclui aquecimento, microondas, raios-gama, raios-X, luz ultravioleta e adsorção. Adsorção de aflatoxinas em aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado e outros materiais inertes tem sido usado na indústria de ração animal na tentativa de reduzir o nível de AFM<sub>1</sub> no leite. O tratamento químico, mais bem sucedido, para degradação de aflatoxinas em ração animal é a amoniação que induz a decomposição de 95% – 98% da AFB<sub>1</sub>, sendo este procedimento usado em vários países (CREPPY, 2002).

GONÇALEZ *et al.* (2004) verificaram a presença das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> no farelo de algodão, sendo que a concentração total de aflatoxinas encontrada foi de 76,4 ng/g, correspondente a 43,5 ng/g de AFB<sub>1</sub>; 15,2 ng/g de AFB<sub>2</sub>; 9,1 ng/g de AFG<sub>1</sub> e 8,6 ng/g de AFG<sub>2</sub>, acima do permitido pela legislação vigente. O leite das

vacas alimentadas por este farelo de algodão apresentou aflatoxina M<sub>1</sub> na concentração  $\geq 0,5$  ng/mL pela análise de CCD e quantificada na concentração de 0,64 ng/mL por CLAE, demonstrando estar acima do permitido pela legislação.

As concentrações de aflatoxinas encontradas no farelo de algodão tiveram como consequência à queda da produção de leite de 14 L/dia para 11 L/dia durante os 6 meses em que foi utilizado como complemento. Outra consequência bastante séria foi a contaminação do leite, que foi comercializado e consumido pelos empregados da fazenda, incluindo crianças, mas não foi relatado nenhum quadro de intoxicação aguda, entretanto a intoxicação crônica não pode ser descartada (GONÇALEZ *et al.*, 2004).

O cuidado com a alimentação animal deve se estender não só aos valores nutricional e econômico, mas também à qualidade do alimento, pois semente de algodão e farelo de algodão são alimentos normalmente utilizados na alimentação de vacas lactantes e, assim como o milho, são muito susceptíveis à contaminação por aflatoxinas (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

A contaminação do leite de consumo humano por AFM<sub>1</sub> assume destacada relevância em saúde pública, ao se considerar que seus efeitos tóxicos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies, sobretudo em animais jovens (CULLEN *et al.*, 1987). Conseqüentemente, torna-se indispensável a adoção de técnicas analíticas exeqüíveis e confiáveis para a detecção e controle desta toxina no leite (SCOTT, 1989).

PURCHASE e STEYN (1967) demonstraram que a aflatoxina M consistia em dois compostos, dihidrohidroxiaflatoxina B<sub>1</sub> e hidroxiaflatoxina B<sub>1</sub>. A fluorescência da aflatoxina M era quase três vezes tão intensa quanto à aflatoxina B<sub>1</sub>.

## 2.4 – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AFLATOXINA B<sub>1</sub>

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450. Estas enzimas são responsáveis pelo metabolismo oxidativo de uma grande variedade dos

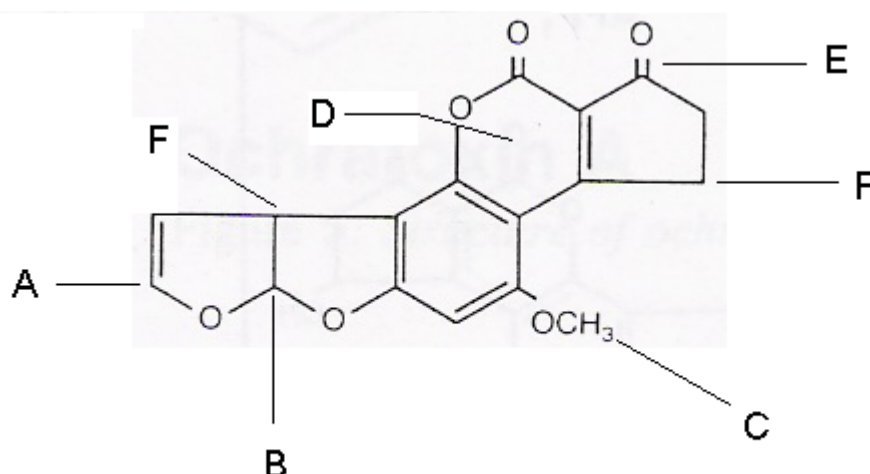
xenobióticos do corpo. A detoxificação dos compostos ocorre por hidroxilação, permitindo ser conjugado com ácido glucurônico ou sulfato. Estes conjugados derivados serão então excretados na urina ou na bile (BIEHL; BUCK, 1987).

GARNER; MILLER e MILLER citados por BIEHL e BUCK (1987) observaram que a bioativação da AFB<sub>1</sub> para um composto intermediário, AFB<sub>1</sub> 8,9-epóxido ou AFB<sub>1</sub>-epóxido, era a responsável pelos efeitos tóxicos vistos em animais. Este composto eletrofílico é altamente ativo e é originado a partir da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB<sub>1</sub> (EMEROLE; NESKOVIC; DIXON citado por OGIDO, R., 2003).

As aflatoxinas ingeridas são substâncias lipofílicas, característica que permite a molécula passar através das membranas celulares, de baixo peso molecular e são quase totalmente absorvidas por difusão passiva no intestino, passando para a corrente sanguínea. No sangue cerca de 90% da AFB<sub>1</sub> liga-se à albumina e pequenos volumes são distribuídos para diversos tecidos. O metabolismo hepático é a principal rota de detoxificação (MELO; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1999).

De acordo com HSIEH *et al.* (1986), a molécula de aflatoxina pode ser ativada através de seis diferentes processos. As possíveis alterações produzidas na biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> estão na Figura 2.

FIGURA 2 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA AFLATOXINA B<sub>1</sub>



FONTE: HSIEH *et al.*, 1986

Onde: A = ataque redutivo ou hidratação da dupla ligação do éter vinílico; B = abertura da estrutura bi-furanóide; C = desmetilação da estrutura metoxi-cumarina; D = fissão hidrolítica da lactona cumarínica; E = redução da ciclopentanona; F = hidroxilação em um ou mais pontos da molécula antes da conjugação.

A forma ativada da AFB<sub>1</sub> faz ligação covalente com vários nucleófilos celulares como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. Estas ligações covalentes determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A AFB<sub>1</sub> 8,9-epóxido também pode sofrer uma conjugação enzimática com uma molécula de glutathione reduzida, através de glutathione S-transferase, e ser excretada na urina ou pela bile. A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com DNA ou RNA do fígado foi demonstrada *in vivo* e *in vitro*. Interações deste tipo são incontestavelmente responsáveis pela carcinogênese e mutagênese das micotoxinas (BIEHL; BUCK, 1987).

A atividade biológica da molécula de DNA que está ligada à AFB<sub>1</sub>-epóxido é alterada, originando assim os mecanismos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub>. A formação desses adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249 do gene supressor de

tumores p53. Esses adutos formados na molécula de DNA podem ser retirados da molécula, após a sua formação, deixando sítios vagos, que tendem a ser preenchidos com adenina, resultando um ponto de mutação bastante significativo (OGIDO, 2003).

As vias do metabolismo da AFB<sub>1</sub> estão representadas na Figura 3. A biotransformação da AFB<sub>1</sub> inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de O-demetilação. Na reação de hidroxilação são formadas as aflatoxinas M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), aflatoxina Q1 (AFQ1) e a aflatoxina B<sub>2a</sub> (AFB<sub>2a</sub>), enquanto que a aflatoxina P1 (AFP1) é formada na reação de O-demetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua conjugação com o ácido glucurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas através da urina, bile e fezes (BIEHL; BUCK, 1987).

O diagrama ilustra o metabolismo da aflatoxina B<sub>1</sub>. No topo, a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é convertida em AFB<sub>2</sub> e em AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido. O AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido pode sofrer conjugação, excreção e detoxificação, ou ligação covalente com 1-Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) e 2-Proteínas, resultando em toxicidade carcinogênica e mutagênica. A AFB<sub>1</sub> também é convertida em Aflatoxina M<sub>1</sub>, Aflatoxina H<sub>1</sub> e Aflatoxina Q<sub>1</sub>. A Aflatoxina M<sub>1</sub> é potencialmente tóxica. A Aflatoxina H<sub>1</sub> e Aflatoxina Q<sub>1</sub> são convertidas em Aflatoxina G<sub>1</sub> e Aflatoxina B<sub>2a</sub>. O processo final leva à conjugação e excreção.

O aflatoxicol (AFL) é produzido pela redução da AFB<sub>1</sub> por uma enzima citoplasmática NADPH-dependente presente na fração solúvel do fígado. A toxicidade do AFL é aparentemente muito menor que AFB<sub>1</sub>, mas a conversão é reversível e o AFL pode servir como reservatório de toxicidade da AFB<sub>1</sub>. AFL pode também ser metabolizado à AFLM<sub>1</sub> e AFLH<sub>1</sub> (BIEHL; BUCK, 1987).

O processo de carcinogênese, fundamentado em trabalhos experimentais, envolve, geralmente, duas fases distintas, a iniciação e a promoção do câncer. A fase de iniciação é resultante de alterações mutagênicas nas células, ao passo que a de promoção relaciona-se com a expressão fenotípica das modificações ocorridas na primeira fase (HARRIS, 1991). Neste contexto, as mutações determinadas pelas

aflatoxinas representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo cancerígeno (HARRIS, 1991).

Os mecanismos de toxidez aguda das AFs estão ligados aos adutos formados pela ligação entre o RNA e proteínas à AFB<sub>1</sub>-epóxido, o que acaba provocando a morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB<sub>1</sub>-epóxido para produzir 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-B<sub>1</sub> (ou B<sub>1</sub>-diol), o qual reage com amino-grupos primários de proteínas, originando bases de Schiff. Os principais adutos de proteínas são formados com albumina durante a sua síntese nos hepatócitos (HSIEH; ATKINSON, 1991).

A inibição da síntese de RNA mensageiro, da atividade da RNA polimerase dependente do DNA, inibição da síntese protéica no fígado e a diminuição das proteínas plasmáticas durante a aflatoxicose são amplamente descritas na literatura. Secundariamente, ocorre redução do metabolismo das gorduras no fígado, causando necrose e degeneração gordurosa, diminuição do fluxo de bile e comprometimento na absorção de nutrientes, especialmente vitaminas e aminoácidos essenciais (TUNG *et al.*, 1975; CURCOVA; LANGROVA; AKAO, 1991; QUEZADA *et al.*, 2000).

As vias de biotransformação da AFB<sub>1</sub> variam entre espécies animais, tal fato poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à AFB<sub>1</sub> entre os indivíduos (WOGAN, 1992). Não há estudos detalhados sobre os tipos e o grau de atividade do citocromo P-450 em aves de produção. KLEIN *et al.* (2000) relatam que já foram identificados nos mamíferos pelo menos seis diferentes tipos de citocromos (citocromo P-450 1A2, 2A3, 2B7, 2C8, 2K1 e 3A3/4), responsáveis pela ativação da molécula de AFB<sub>1</sub>. A presença ou ausência de um ou mais desses citocromos, bem como o seu grau de atividade podem determinar a susceptibilidade da espécie animal à AFB<sub>1</sub>, dentre outros fatores.

A maioria das aflatoxinas é excretada entre 72-96 horas depois de interromper sua exposição, com o fígado e o rim retendo os resíduos por mais tempo que outros tecidos (BIEHL; BUCK, 1987).



## 2.5 – AFLATOXINA M<sub>1</sub>

### 2.5.1 – Importância do Leite

O leite é um dos alimentos mais completos largamente utilizado na alimentação humana, principalmente por crianças (POLEGATO; RUDGE, 2003). É reconhecidamente um alimento de grande valor nutritivo, fornecendo ao homem macro e micro nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde (TINÔCO *et al.*, 2002).

Obtido em circunstâncias naturais, o leite é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado. É secretado pelas glândulas mamárias, sendo alimento indispensável aos primeiros meses de vida dos mamíferos (ALBUQUERQUE, 1997).

O leite é a melhor fonte de cálcio para o organismo. O cálcio é importante na formação de ossos e dentes, na coagulação sangüínea e na regulação dos batimentos cardíacos. Sua carência provoca o raquitismo (fragilidade dos ossos), ocasionando fraturas com maior facilidade. Além disso, as proteínas do leite são completas, propiciando a formação e manutenção dos tecidos. O leite contém vitamina A, B1, B2 e minerais que favorecem o crescimento e a manutenção de uma vida saudável. Possui boa quantidade de fósforo, que também ajuda na formação dos ossos. Além disso, dois copos diários de leite já atendem a quase toda a recomendação, por exemplo, de manganês, nutriente importante no aproveitamento das gorduras e no funcionamento do cérebro. A indústria de laticínio tem potencializado o valor nutritivo dos produtos. Existe no mercado uma série de bebidas lácteas enriquecidas com vitaminas, minerais e ômega, assim como leites especiais para as pessoas que não conseguem digerir a lactose (CODEAGRO, 2005; EMBRAPA, 2005a).

Apesar de ser um alimento altamente nutritivo, o leite pode ser o agente causador de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que o consome. Uma vez contaminado, permite que microrganismos presentes, bem como seus produtos metabólicos invadam os fluídos ou os tecidos do hospedeiro, causando doenças graves. A presença de aflatoxinas no leite é de extrema relevância, pelo fato de

lactação e alimentação serem dois processos concomitantes. Além disso, o leite é alimento básico para crianças e recém-nascidos, que, por analogia, devem ser mais susceptíveis que os adultos aos efeitos tóxicos das aflatoxinas (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

A tendência de produção de leite para os próximos anos é de um aumento mundial do volume produzido, principalmente nos países em desenvolvimento onde existem condições climáticas favoráveis para a atividade, permitindo o pastejo dos animais na maior parte do ano, diminuindo os custos de alimentação, mão-de-obra e de capital empregado. Estas tendências indicam uma migração da produção para áreas mais populosas e com menor custo de produção. No Brasil, confirma-se essa tendência de aumento da produção de leite, particularmente nas regiões de cerrado (EMBRAPA, 2005b).

De acordo com a legislação vigente, Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, leite pasteurizado é o leite fluído elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador. É classificado quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3% m/m (três por cento, massa/massa), semidesnatado ou desnatado, e, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluída, submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 seg. (BRASIL, 2002b).

Em 15 anos, a produção nacional de leite passou de 11,1 bilhões de litros para 25,7 bilhões. Isto representa um crescimento de 131% entre os anos de 1980 e 2006, transformando o País, de tradicional importador, em exportador de lácteos. O Brasil é o sétimo maior produtor de leite do mundo, estando atrás dos Estados Unidos, Índia, Rússia, Alemanha, França e China, respectivamente (EMBRAPA, 2006a).

No Brasil, o primeiro trimestre de 2006 registrou aquisição de 4,174 bilhões de litros de leite, segundo a Pesquisa Trimestral do Leite. Este volume indica uma redução de 4,56% na produção de leite em relação ao quarto trimestre de 2005, e um aumento de 4,99% sobre o primeiro trimestre de 2005. Os principais estados em aquisição de leite são: Minas Gerais (28%), Goiás (13%), São Paulo e Rio Grande

do Sul com 12% cada um. No trimestre, o mês de maior aquisição de leite foi janeiro com 1,484 bilhão de litros de leite recebidos pelos estabelecimentos industriais (IBGE, 2006).

Dados do Ministério da Saúde demonstram que o brasileiro deveria consumir, em média, 200 litros de leite por ano, seja na forma fluida ou na de produtos lácteos. No entanto, o consumo médio no país, cerca de 120 litros por habitante/ano, está muito aquém do recomendado. O leite é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana. A necessidade do produto varia conforme a faixa etária da pessoa (Tabela 3). Uma vida saudável depende deste alimento que, pela potencialidade da pecuária de leite nacional, pode se tornar acessível à totalidade da população (EMBRAPA, 2006b).

**TABELA 3 – CONSUMO MÍNIMO DE LEITE PARA O HOMEM**

VOLUME MÍNIMO DE LEITE	FAIXA ETÁRIA
400 mL/dia (146L/ano)	Crianças de até 10 anos
700 mL/dia (256L/ano)	Jovens de 11 a 19 anos
600 mL/dia (219L/ano)	Adultos acima de 20 anos (inclusive idosos)

FONTE: EMBRAPA, 2006b

Para atender ao mercado interno potencial, composto de 175 milhões de pessoas, um consumo *per capita* de 600 mL/dia demandaria uma produção anual de 38,3 bilhões de litros de leite. E mesmo assim estaria explorando apenas dois terços da capacidade produtiva, restando ainda um amplo mercado externo a conquistar. O primeiro passo para tornar o Brasil exportador de lácteos já foi dado, recentemente, com a assinatura da Instrução Normativa Nº 51, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. As novas normas estabelecem critérios para a produção com qualidade. O incremento na qualidade que a Instrução Normativa pretende trazer tornará o nosso produto um dos mais competitivos no mercado internacional (EMBRAPA, 2006b).

### 2.5.2 – Aflatoxina M<sub>1</sub> em Leite e Derivados

A excreção de AFM<sub>1</sub> no leite tem sido estudada, principalmente em vacas leiteiras, uma vez que este alimento constitui uma das principais fontes de nutrientes para os seres humanos, particularmente à população infantil. Para prevenir a contaminação do leite com AFM<sub>1</sub> em níveis inferiores a 0,5 µg/L, é necessário estabelecer a taxa de conversão de aflatoxinas em alimentos naturalmente contaminados, pois a quantidade de AFM<sub>1</sub> excretada pelo leite é diretamente proporcional à quantidade de AFB<sub>1</sub> ingerida, sendo detectada no leite dois dias após a ingestão e desaparecendo três a quatro dias após a retirada da AFB<sub>1</sub> da dieta (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

A ingestão diária aceitável de aflatoxina M<sub>1</sub> é de 6,8 ng/pessoa/dia na Europa; 3,5 ng/pessoa/dia na América Latina; 12 ng/pessoa/dia no Extremo Oriente e 0,7 ng/pessoa/dia na África (CREPPY, 2002).

A ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de vacas lactantes é uma questão de saúde pública, pois o leite e seus derivados são consumidos por bebês, crianças e adultos em todo mundo. Essa toxina é classificada como possível carcinógeno para o homem (classe 2B), sendo também observado uma alta atividade genotóxica em animais de experimentação (LÓPEZ *et al.*, 2001). Portanto, a Organização Mundial de Saúde recomenda a redução do consumo de aflatoxina M<sub>1</sub> para um nível que minimize o risco potencial de sua ingestão. Para isso, muitos países regulamentaram o limite máximo permitido de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite (LÓPEZ *et al.*, 2001). No Brasil, o limite máximo de aflatoxina M<sub>1</sub> permitido segue a definição do Mercosul, GMC/RES n°56/94, onde estabelece 0,5 µg/L (ppb) em leite fluído e 5,0 µg/L (ppb) para leite em pó (BRASIL, 1995).

Em um trabalho conduzido por EL-NEZAMI *et al.* (1995), foi verificada a exposição de crianças à AFM<sub>1</sub> e mães lactantes à aflatoxina B<sub>1</sub>. Análise de leite de 73 mulheres originárias de Victória (Austrália) e 11 da Tailândia revelaram positividade para AFM<sub>1</sub> em uma concentração média de 71 ng/L e 664 ng/L, respectivamente.

A estabilidade da aflatoxina no leite e seus derivados durante processos de tratamento pelo calor tem sido pesquisada e os resultados têm causado discordância entre pesquisadores. STOLOFF *et al.* (1975) estudaram amostras de leite

artificialmente contaminadas e submetidas à pasteurização lenta (62°C por 30 min), bem como amostras de leite naturalmente contaminadas submetidas à pasteurização rápida (77°C por 16 seg.) e não observaram redução na concentração de aflatoxina M<sub>1</sub>.

PURCHASE *et al.* (1972) demonstraram que a pasteurização a 62°C por 30 minutos causava uma redução de 32% da aflatoxina M<sub>1</sub>. A redução foi de 45% e 64% quando o leite foi submetido a temperaturas de 72°C e 80°C por 45 segundos, respectivamente.

Estudos sobre a estabilidade da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite durante armazenamento sob condições de resfriamento e congelamento também apresentaram resultados variáveis: em amostras de leite cru, naturalmente contaminadas e armazenadas a 0°C por quatro e 6 dias, a redução na concentração ocorreu rapidamente, com perdas de 40% e 80%, respectivamente (MCKINNEY *et al.*, 1973).

Já o efeito do congelamento, em amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina M<sub>1</sub> e armazenadas a -18°C, apresentou baixa degradação e esta ocorreu lentamente. Os resultados demonstraram que aos 53 dias não houve redução, sendo verificada pequena variação aos 68 dias. Aos 120 dias, houve perda de 45% da aflatoxina M<sub>1</sub> (STOLOFF *et al.*, 1975). Em amostras armazenadas a -18 °C por 120 dias, a diminuição na concentração de AFM<sub>1</sub> ocorreu mais lentamente, com perdas de 14% aos 30 dias e 86% aos 120 dias (MCKINNEY *et al.*, 1973).

GALVANO *et al.* (1998) observaram que não houve redução do nível de AFM<sub>1</sub> no processo de fermentação de iogurte com leite contaminado artificialmente. A concentração de AFM<sub>1</sub> poderia, até mesmo, aumentar devido ao processo de condensação. Foi demonstrado que em 114 amostras de iogurte 91 (80%) apresentavam AFM<sub>1</sub> com concentrações entre 1 – 496,47 ng/kg. KIM *et al.* (2000) detectaram a presença de AFM<sub>1</sub>, com concentrações entre 17–124 ng/kg, em 50% das 60 amostras analisadas.

A aflatoxina M<sub>1</sub> no leite associa-se à fração protéica (caseína), ficando nela retida mesmo após a pasteurização e o beneficiamento para a produção de derivados. Na fabricação de derivados do leite, o desnatamento tem mostrado afetar a distribuição de aflatoxina M<sub>1</sub> no produto final. Como ela fica associada à caseína, durante o desnatamento do leite integral, 84% do total do conteúdo de aflatoxina M<sub>1</sub>

fica retido no produto desnatado (MARTINS; MARTINS, 1986). A concentração da matéria-prima, como a que se obtém na fabricação do leite em pó, leite condensado, requeijão e queijos, pode aumentar a proporção de aflatoxina M<sub>1</sub> no produto final, em função da diminuição do teor de água (LÓPEZ *et al.*, 2001).

HASSANIN (1994) investigou a estabilidade da aflatoxina M<sub>1</sub> durante a produção e o armazenamento de iogurte, queijo e leite acidificado. O autor conclui que a aflatoxina M<sub>1</sub> do leite é transmitida para os produtos preparados. A presença de AFM<sub>1</sub> no queijo pode ser devido por um lado, ao fato da toxina se ligar à caseína, e por outro lado, que parte do soro do leite permanece preso ao coalho.

WISEMAN e MARTH (1983) investigaram a estabilidade da aflatoxina M<sub>1</sub> durante a produção e o armazenamento de manteiga, leite em pó desnatado e leiteiro (leite ácido semidesnatado) em pó. Embora com valores variados, a aflatoxina M<sub>1</sub> permanecia estável nos produtos, confirmando desta forma a transmissão.

É possível que outras formas de aflatoxinas apareçam em alguns produtos lácteos, como o queijo, se o fungo toxigênico crescer durante seu armazenamento em condições favoráveis (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

Vários pesquisadores notaram uma tendência sazonal na contaminação do leite por AFM<sub>1</sub>. Os índices menores ocorreram durante os meses de verão, quando os animais são comumente alimentados com pastagens, o contrário do que acontece no inverno, quando os animais são alimentados com rações (GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996).

Outras micotoxinas, como aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>, esterigmatocistina, ocratoxina, toxina T-2 e fumonisinas, podem ocorrer no leite e derivados bem como no leite humano, embora em quantidades menores. Porém, a principal forma é a aflatoxina M<sub>1</sub> (APPLEBAUM *et al.*, 1982; GALVANO; GALOFARO; GALVANO, 1996).

### 2.5.3 – Métodos de Análise de CCD e CLAE para Aflatoxina M<sub>1</sub> em Leite Associados à Coluna de Imunoafinidade

Os dois métodos mais utilizados para análise de AFM<sub>1</sub> em leite de vaca são CCD e CLAE. Para tornar a análise ainda mais exata é utilizada a coluna de imunoafinidade, uma etapa de limpeza a mais no processo. Para padronizar a metodologia utilizada (IAL, 2004), foi determinado o limite de detecção e limite de quantificação do método de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade, segundo INMETRO (2003).

Com relação aos métodos de análise para controles eficientes de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite, são requeridos elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além de limites de detecção e quantificação suficientes para avaliação das baixas concentrações em que estas micotoxinas são encontradas (SOUZA *et al.*, 2003). Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constituem as técnicas oficiais e convencionais para separação, detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em extratos de leite (VAN EGMOND; DEKKER, 1995).

De qualquer forma, independente da técnica analítica empregada no método, procedimentos de validação devem ser adotados, permitindo avaliar a eficiência de cada metodologia, conhecendo seu potencial aplicativo e limitações (SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999).

Entretanto, devido à multiplicidade de técnicas utilizadas para detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub>, variando das mais simples, como CCD por análise visual e densitometria, até as mais complexas, como CLAE com detectores de ultravioleta, fluorescência e espectrometria de massa, os laboratórios selecionam as técnicas de acordo com sua situação econômica, objetivos da análise e capacidade dos analistas (SOUZA *et al.*, 2003).

A metodologia para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite melhorou marcadamente com a aplicação da tecnologia de coluna de imunoafinidade, que proporciona uma etapa para a análise combinando extração e purificação (MORTIMER; GILBERT; SHEPHERD, 1987).

Atualmente, a metodologia mais precisa é baseada na extração com solventes orgânicos, uma purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a

detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. A maior vantagem do uso de colunas de imunoafinidade para a purificação nas análises de micotoxinas é a habilidade de extrair essencialmente a toxina produzida em diferentes matrizes, obtendo altas recuperações e produzindo um cromatograma livre de interferentes (SHARMAN; GILBERT, 1991).

Como a relação entre a ingestão de aflatoxina e a excreção de AFM<sub>1</sub> no leite é muito variável, e em níveis da ordem de partes por trilhão, há necessidade da análise direta da AFM<sub>1</sub> no leite utilizando-se métodos analíticos de maior sensibilidade como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando coluna de imunoafinidade como técnica de purificação (SCOTT, 1989; HANSEN, 1990; TUINSTRA; ROOS; VAN TRIJP, 1993).

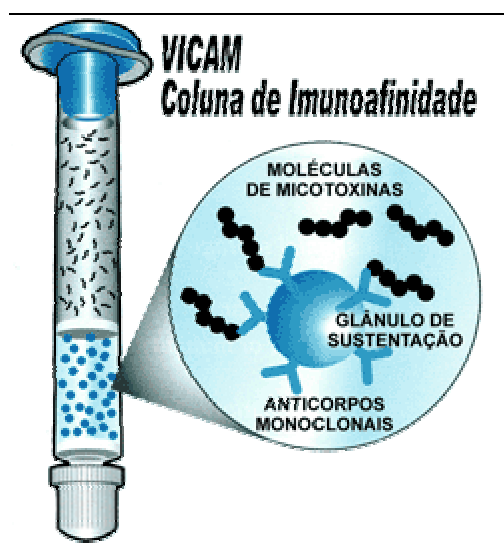
A CCD constitui a técnica tradicional para determinação de micotoxinas e possui grande importância histórica relacionada a estas substâncias. Graças a CCD, as micotoxinas foram detectadas, isoladas e caracterizadas (BECKWITH; STOLOFF, 1968). A AOAC (2000) recomenda esta técnica para determinação de aflatoxinas em diversos produtos. O baixo custo e a simplicidade são as principais vantagens dos procedimentos analíticos baseados na CCD. A capacidade de separação das micotoxinas dos componentes interferentes, em placas de CCD, confere um razoável nível de especificidade e sensibilidade ao método. Isto se deve ao fato de que a aflatoxina M<sub>1</sub> fluoresce sob luz UV, o que permite que concentrações da ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa. A principal desvantagem desta técnica é a baixa repetibilidade associada à aplicação das amostras, desenvolvimento e etapas de interpretação, o que pode ser melhorado com a experiência dos analistas. Estudos interlaboratoriais com livre escolha do método demonstraram que a experiência na determinação de aflatoxina M<sub>1</sub>, uma análise difícil, é, pelo menos, tão importante quanto à escolha da técnica para obtenção de resultados confiáveis (SOUZA *et al.*, 2003).

A cromatografia de imunoafinidade, em que as colunas contêm anticorpos seletivos imobilizados para aflatoxinas, tornou-se um método muito válido, pois com as colunas de imunoafinidade (Figura 4) o procedimento para o pré-tratamento da amostra total é reduzido a uma única extração em fase sólida (MORTIMER; GILBERT; SHEPHERD, 1987). A purificação e separação da amostra utilizando colunas de imunoafinidade são particularmente eficazes para a detecção de



aflatoxinas, passando a amostra diretamente através da coluna e depois de várias lavagens, a aflatoxina é eluída num extrato muito limpo e adequado para ser analisado por CLAE. Segundo GILBERT (1993), os cromatogramas utilizando coluna de imunoafinidade são mais limpos (claros) e o tempo de análise é muito mais rápido se fosse trabalhar com o método convencional.

FIGURA 4 – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE



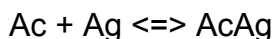
FONTE: VICAM, 2005

KOHLER e MILSTEIN (2005) realizaram trabalhos através dos quais conseguiram obter um clone celular produzindo um só anticorpo com especificidade bem definida chamado, por isso, anticorpo monoclonal. São de pureza elevada e mais sensível às condições de ligação do que os anticorpos policlonais, que podem apresentar reações cruzadas com outras moléculas.

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais baseia-se na fusão de células de mieloma com células de baço de um animal imunizado, provendo assim, hibridomas capazes de crescerem indefinidamente em meio de cultura com a capacidade de produção de anticorpos, os quais uma vez clonados, apresentam-se altamente específicos. Depois de serem produzidos, os anticorpos são purificados

pelo processo clássico de precipitação com sulfato de amônio, que por sua vez é removido por diálise, por cromatografia de troca iônica ou de permeação de gel (KATZ; SIEWIERSKI, 1992).

Na cromatografia de imunoafinidade ocorre uma separação seletiva através da reação anticorpo-antígeno (Ac–Ag):



As características mais importantes exigidas para os anticorpos a serem utilizados nas colunas de imunoafinidade são a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem e reversibilidade. É também essencial que o complexo aflatoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a aflatoxina. O suporte inerte sólido, onde os anticorpos são imobilizados na coluna por uma ligação covalente, é constituído por agarose gel, trisacril, poliacrilamida ou celulose, previamente ativados por uma reação com brometo de cianogênio ou com carbonildiimidazol, formando-se o imunoadsorvente. O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada a amostra ou o extrato aquoso a analisar. Por um processo de interação imunoquímica, as moléculas do analito vão ser fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes não ligados ao suporte, que possam encontrar-se na coluna, são eliminados por lavagem da coluna com uma solução salina de tampão fosfato (KATZ; SIEWIERSKI, 1992).

Embora a cromatografia de imunoafinidade seja uma técnica quer de extração quer de purificação da amostra considerada por vários investigadores superior a muitas outras, é necessário não esquecer a fragilidade das colunas e o perigo de contaminação de uma extração/purificação para outra (no caso das colunas serem reutilizadas) e, por outro lado, o número de moléculas que podem ser controladas, dado este sistema ser restrito, devido à falta de anticorpos disponíveis no comércio. Uma outra desvantagem é o custo elevado dos kits (AMADO, 2002).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1– MATERIAL

##### 3.1.1 – Amostras

Para a realização das análises, foi utilizado leite pasteurizado tipo C padronizado e homogeneizado proveniente de 21 Distritos Sanitários do Estado do Paraná no período de dezembro de 2005 a março de 2006. Foram coletadas 40 amostras de leite pela Vigilância Sanitária do Paraná e analisadas no Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN/PR. As amostras de leite foram conservadas sob refrigeração a 2 – 8°C.

##### 3.1.2 – Colunas de Extração

Colunas de imunoafinidade Afla M<sub>1</sub> da marca VICAM foram conservadas sob refrigeração a 2-8°C até 30 minutos antes da análise para que no momento da mesma estivessem a temperatura ambiente.

##### 3.1.3 – Reagentes

- Ácido acético glacial (Carlo Erba);
- Ácido trifluoroacético (TFA);
- Acetonitrila, grau CLAE;
- Ácido sulfúrico (Merck);
- Clorofórmio (Merck);
- Hexano (Merck);
- Isopropanol (Merck);

- Metanol, grau CLAE;
- Nitrogênio;
- Padrão de Aflatoxina M<sub>1</sub> – R-Biopharm RHÔNE LTD;
- Tolueno (Merck).

#### 3.1.4 – Equipamentos e Materiais Diversos

- Agitador de tubos tipo Vortex;
- Cabine com lâmpada UV ( $\lambda$  =366 nm);
- Centrífuga, marca FANEN;
- Concentrador de amostras – modelo TE-019, marca TECNAL;
- Cromatofolhas ou cromatoplasas de sílica gel, 20 x 20 cm, marca Merck;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, marca Varian com detector de fluorescência modelo 363 (excitação de 360 nm e emissão de 430 nm), bomba quaternária modelo 240, auto-amostrador modelo 410, coluna de fase reversa ChromSep SS 250 x 4,6 mm, precedida de pré coluna OmniSpher 5 C18;
- Cuba cromatográfica;
- Espectrofotômetro – modelo DR/4000 U, marca HACH;
- Filtro Nylon-66, 0,45  $\mu$ m de poro, marca Varian;
- Microseringas de 10, 25, 50, 100 e 250  $\mu$ L;
- Milli-Q Plus – Ultra-Pure Water System, marca Millipore;
- Sistema Millipore a vácuo;
- Ultrassom – modelo Thornton T14, marca Engelab;
- *Vials* para injetor automático de 2,0 mL.

### 3.2– MÉTODOS

#### 3.2.1 – Solução Padrão de Aflatoxina M<sub>1</sub>

Inicialmente, foi verificada a calibração do espectrofotômetro, através da leitura das absorbâncias das soluções de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM, em comprimento de onda de 350 nm, usando como branco solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 0,009 M, para a determinação de seu fator de correção (AOAC, 2000), através da seguinte fórmula:

$$\varepsilon = \frac{A \times 1000}{\text{Concentração em mM}}$$

onde:  $\varepsilon$  = absortividade molar de cada solução de  $K_2Cr_2O_7$ ;

A = absorbância de cada solução de  $K_2Cr_2O_7$ .

Após calcular a absortividade molar de cada solução de  $K_2Cr_2O_7$  (0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM), foi realizada a média dos 3 valores de  $\varepsilon$ , para determinar o fator de correção através da seguinte fórmula:

$$FC = \frac{3160}{\varepsilon \text{ médio}}$$

onde: FC = fator de correção do espectrofotômetro;

$\varepsilon$  médio = média dos 3 valores de  $\varepsilon$ , obtidos de cada solução de  $K_2Cr_2O_7$  (0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM);

3160 = valor de  $\varepsilon$  para a solução de  $K_2Cr_2O_7$ .

O intervalo de aceitabilidade do fator de correção do espectrofotômetro deve ser:  $1,05 > FC > 0,95$ .

O padrão primário de aflatoxina M<sub>1</sub> já se apresentava diluído em acetonitrila, tendo sido importado desta maneira. De acordo com a AOAC (2000), foi lida sua absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de máxima absorção, 350 nm. A concentração da micotoxina foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g de micotoxina/mL} = \frac{A \times CF \times PM \times 1000}{\varepsilon}$$

onde: A = absorbância medida no espectrofotômetro;

CF = fator de correção do equipamento;

PM = peso molecular da micotoxina;

$\varepsilon$  = absortividade molar da micotoxina.

### 3.2.2 – Curva de Calibração

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque cuja concentração era 2,0 µg/L de aflatoxina M<sub>1</sub> em acetonitrila, a partir da qual foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 µg/L. De cada ponto da curva foram realizadas cinco injeções, obtendo-se a média das leituras dos mesmos para a construção da curva de calibração.

O volume de injeção foi 100 µL e foram feitas da menor para a maior concentração, com lavagens do amostrador automático entre as injeções por no mínimo três vezes antes e após leitura de cada ponto, para evitar contaminações entre as injeções.

### 3.2.3 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método

Segundo INMETRO (2003), quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito.

Já o limite de quantificação do método é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade.

### 3.2.4 – Fortificação das Amostras de Leite para Teste de Recuperação

Os valores adotados como referência para avaliação do teste de recuperação para aflatoxina M<sub>1</sub> foram estabelecidos pela EC (1998), onde são considerados aceitáveis os seguintes valores:

- Para AFM<sub>1</sub> com concentrações entre 0,01 – 0,5 µg/L ⇒ os valores de porcentagem de recuperação devem estar entre 60% – 120%;
- Para AFM<sub>1</sub> com concentrações maiores que 0,5 µg/L ⇒ os valores de porcentagem de recuperação devem estar entre 70% – 110%.

#### 3.2.4.1– Método de CCD

As amostras de leite pasteurizado tipo C padronizado e homogeneizado foram fortificadas com concentrações do padrão correspondentes a 0,01, 0,02, 0,03, 0,3 e 0,5 µg/L. Para cada nível de concentração foram realizadas cinco repetições.

#### 3.2.4.2– Método de CLAE

As amostras de leite pasteurizado tipo C padronizado e homogeneizado foram fortificadas com concentrações do padrão correspondentes a 0,01, 0,02 e 0,5 µg/L. Para cada nível de concentração foram realizadas cinco repetições.

#### 3.2.5 – Determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub>

Os métodos utilizados para AFM<sub>1</sub> foram baseados no procedimento descrito pelo IAL (2004) e estão esquematizados na Figura 7, no item 3.2.5.1.4, para CCD e Figura 9, no item 3.2.5.2.4, para CLAE.

##### 3.2.5.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

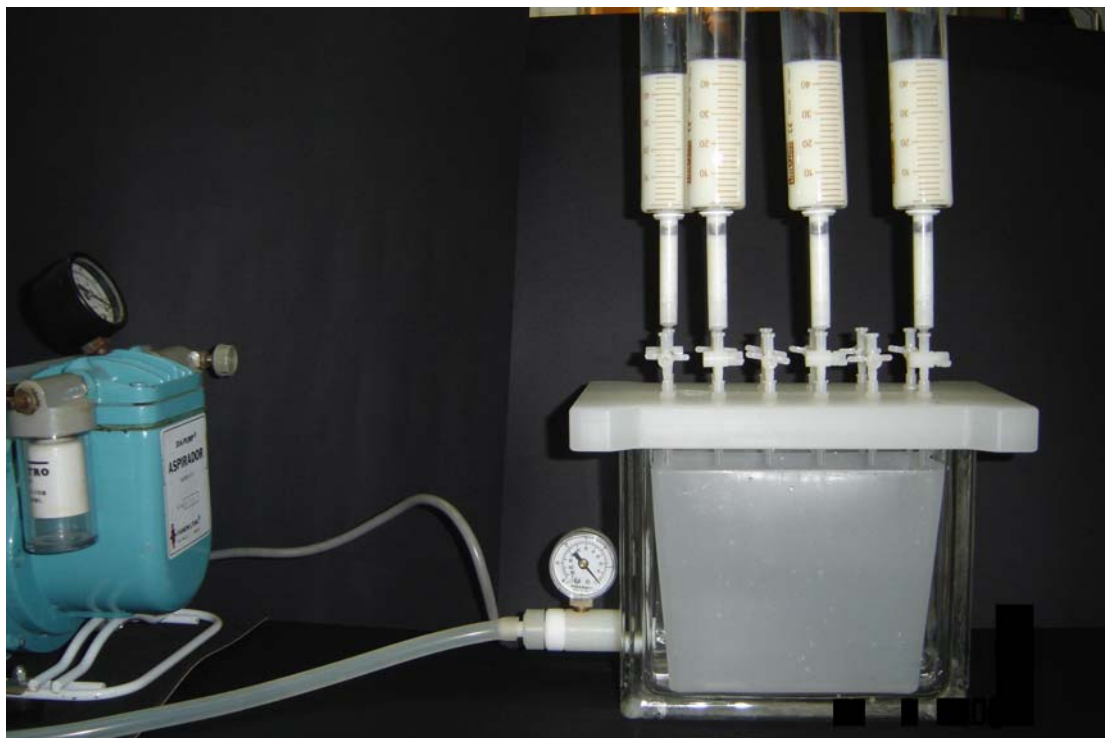
###### 3.2.5.1.1 – Preparação e tratamento da amostra

Foi centrifugada uma alíquota de 100 mL de leite por 15 min a 3000 rpm. Retirou-se a camada de gordura e o volume total foi aquecido a 37°C. O leite foi transferido para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade onde passou lentamente pela coluna com fluxo de 2-3 mL por minuto sob pressão constante (Figura 5).

Após a passagem de todo o volume, a coluna foi lavada com 40 mL de água deionizada para retirada dos possíveis interferentes da coluna. Eliminou-se, então, toda a água residual da coluna que foi eluída inicialmente com 2,5 mL de uma solução de acetonitrila/metanol (3:2, v/v), sendo esta solução retida por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e em seguida com 2,5 mL de metanol, invertendo-se suavemente o fluxo por três vezes durante a eluição. O extrato eluído foi evaporado até resíduo sob corrente de nitrogênio.



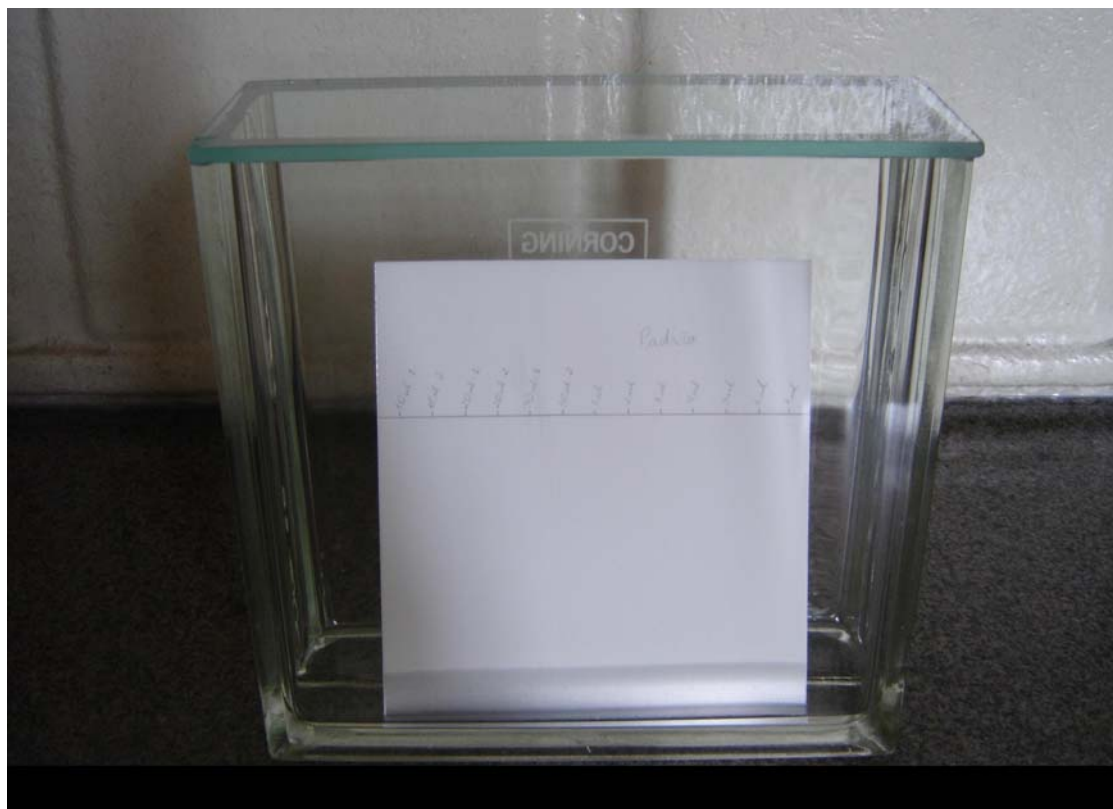
FIGURA 5 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO A VÁCUO DA AFLATOXINA M<sub>1</sub>



#### 3.2.5.1.2 – Separação, quantificação e confirmação

O resíduo foi ressuspendido com 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de tolueno/acetonitrila (9:1, v/v), sendo misturado em um agitador. Sobre uma placa cromatográfica foi aplicado 50  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra e paralelamente com padrões em diferentes níveis de concentração. Desenvolveu-se o cromatograma (Figura 6), ao abrigo da luz, em fase móvel composta de uma solução de clorofórmio/acetona/isopropanol (87:10:3, v/v). Removeu-se a placa após 12 cm de desenvolvimento do solvente secando naturalmente ao ar. Sob luz UV ( $\lambda=366\text{ nm}$ ), localizou-se as manchas fluorescentes da AFM<sub>1</sub> de cor azul. A quantificação foi feita através de comparação visual da amostra com padrões de concentrações conhecidas e a confirmação por pulverização com ácido sulfúrico (1+3) e derivação, quando necessário, com ácido trifluoroacético (TFA).

FIGURA 6 – DESENVOLVIMENTO DA PLACA CROMATOGRÁFICA



#### 3.2.5.1.3 – Cálculo

$$\mu\text{g/L de AFM}_1 : \frac{AP \times CP \times VS}{MA \times VL}$$

onde: AP =  $\mu\text{L}$  de aflatoxina  $M_1$  padrão, de fluorescência igual à da amostra;

CP = concentração-padrão de aflatoxina  $M_1$  em  $\mu\text{g/mL}$ ;

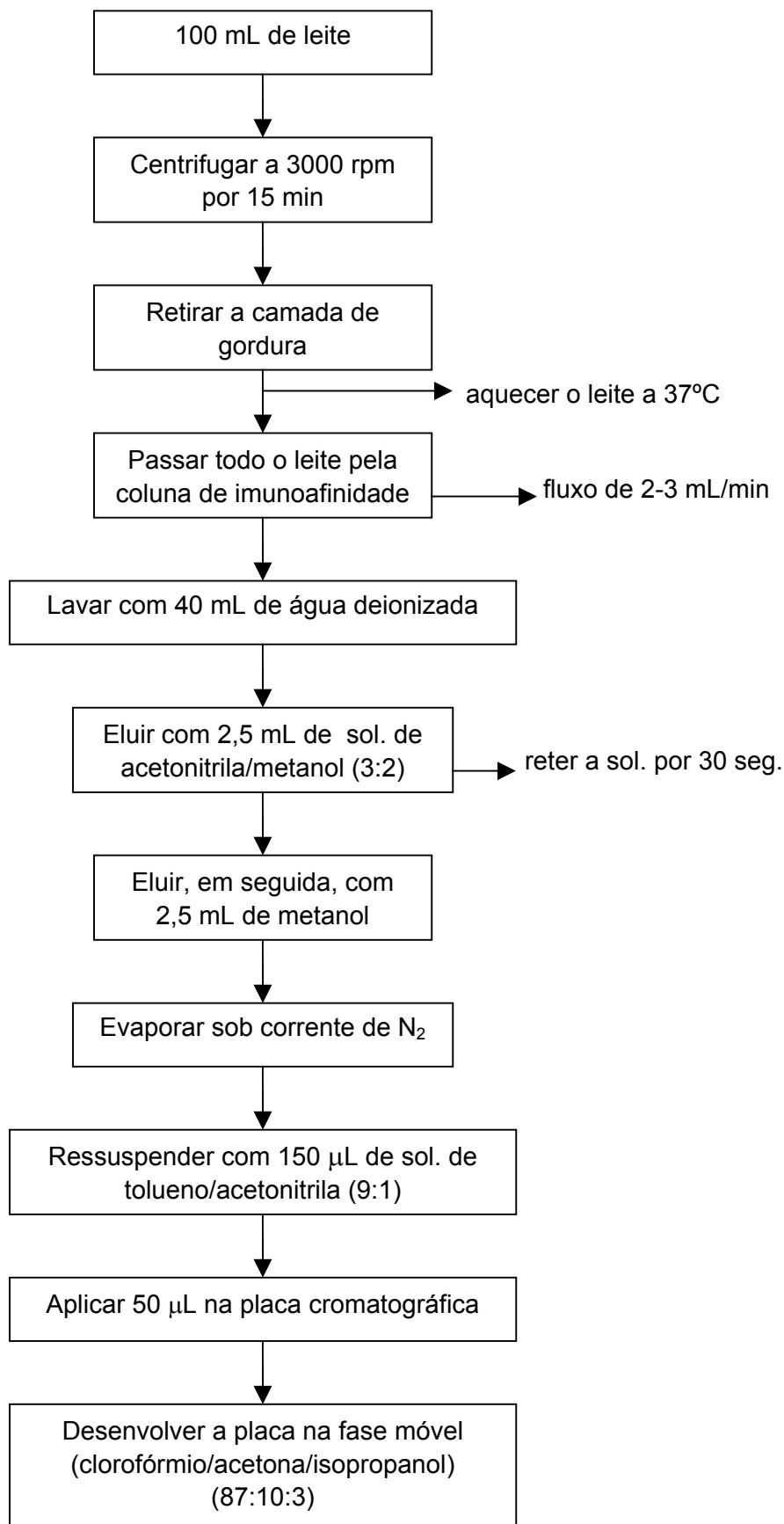
VS =  $\mu\text{L}$  de solvente requerido para diluir o extrato final;

MA =  $\mu\text{L}$  da mancha do extrato da amostra que deu intensidade de fluorescência igual à do padrão;

VL = volume de leite contido no extrato final.

#### 3.2.5.1.4 – Diagrama

FIGURA 7 – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA



### 3.2.5.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 3.2.5.2.1 – Preparação e tratamento da amostra

Foi centrifugada uma alíquota de 50 mL de leite por 15 min a 3000 rpm. Retirou-se a camada de gordura e o volume total foi aquecido a 37°C. O leite foi transferido para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade onde passou lentamente pela coluna com fluxo de 2-3 mL por minuto sob pressão constante.

Após a passagem de todo o volume, a coluna foi lavada com 10 mL de água deionizada para retirada dos possíveis interferentes da coluna. Eliminou-se, então, toda a água residual da coluna que foi eluída inicialmente com 1,25 mL de uma solução de acetonitrila/metanol (3:2, v/v), sendo esta solução retida por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e em seguida com 1,25 mL de metanol, invertendo-se suavemente o fluxo por três vezes durante a eluição. O extrato eluído foi evaporado até resíduo sob corrente de nitrogênio.

#### 3.2.5.2.2 – Separação, quantificação e confirmação

O resíduo foi ressuspenso com 500 µL de uma solução de ácido acético 1%/acetonitrila/metanol (40:35:25, v/v). Uma alíquota de 100 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência (Figura 8) para a separação da toxina e a quantificação foi efetuada utilizando detector de fluorescência.

A fase móvel utilizada foi ácido acético 2%/acetonitrila/metanol (40:35:25, v/v), sendo filtrada previamente em sistema Millipore a vácuo e degaseificada em ultrassom. O tempo de corrida estabelecido foi de 8 min com fluxo de 1,0 mL/min e detecção de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 430 nm. A coluna cromatográfica foi mantida à temperatura de 35°C.

FIGURA 8 – CROMATOGRÁFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA



#### 3.2.5.2.3 – Cálculo

$$\mu\text{g/L de AFM}_1 : \frac{A \times C' \times VI' \times V}{A' \times VI \times VL}$$

onde: A = altura do pico da amostra;

A' = altura do pico do padrão;

C' = concentração do padrão (ng/μL);

VI' = volume injetado do padrão;

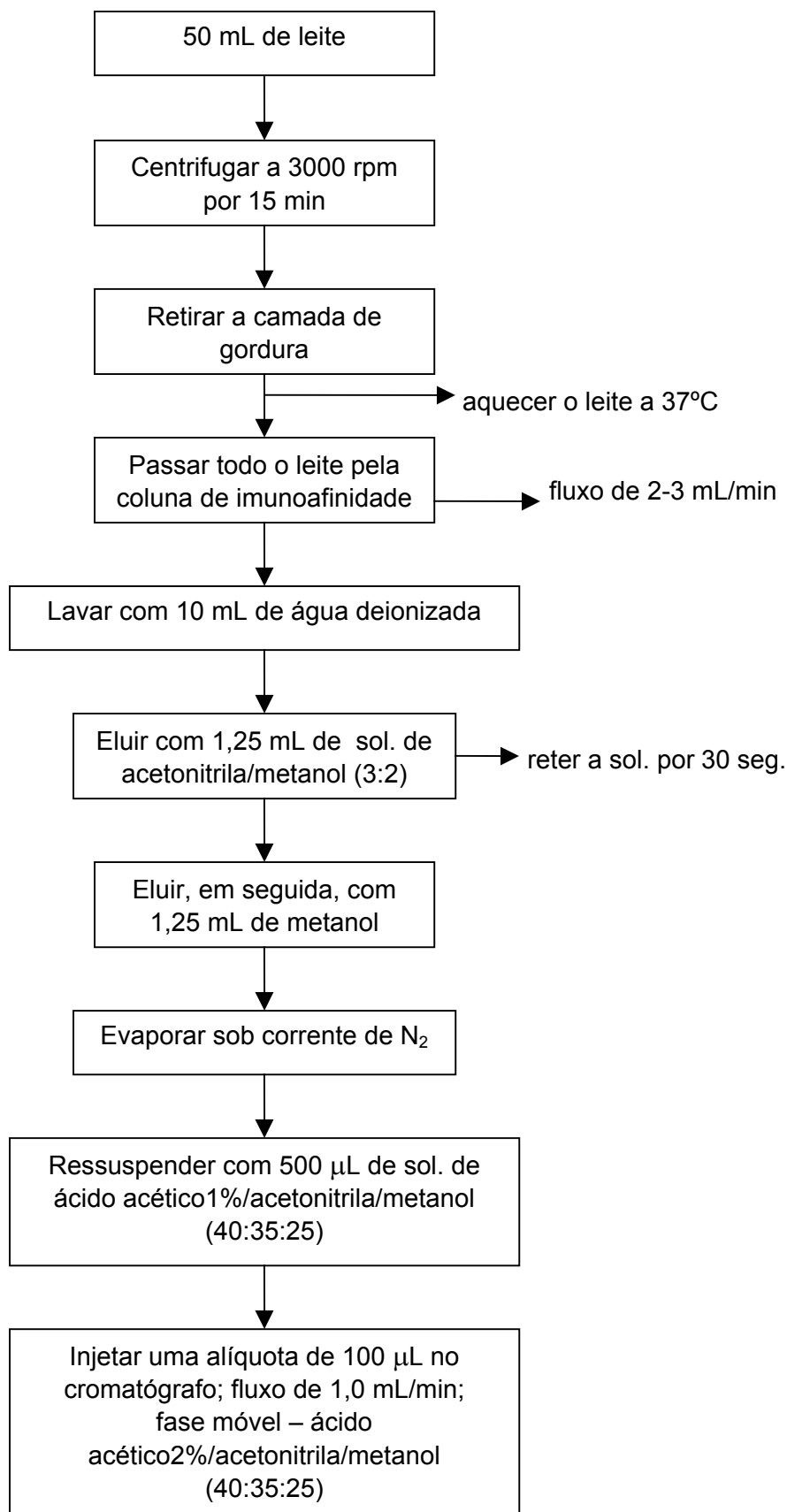
VI = volume injetado da amostra;

V = volume final da amostra (μL);

VL = volume de leite representado no final do extrato (mL).

#### 3.2.5.2.4 – Diagrama

FIGURA 9 – DIAGRAMA DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA



### 3.2.6 – Análise Estatística

O tratamento estatístico utilizado para comparar as duas técnicas (CCD e CLAE) foi o teste t de Student pareado. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados também foram à análise estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação).

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se do programa computadorizado MSTAT-C, versão 2.10 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 1989).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS

Neste trabalho foram comparadas duas técnicas, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação de AFM<sub>1</sub> em leite, ambas utilizando coluna de imunoafinidade.

#### 4.1.1 – Determinação da Concentração do Padrão de Aflatoxina M<sub>1</sub>

A concentração do padrão de AFM<sub>1</sub> foi determinada em espectrofotômetro de acordo com a técnica descrita pela AOAC (2000) no item 3.2.1.

O fator de correção do espectrofotômetro apresentou valor 1,0, mostrando-se apto para determinar a concentração do padrão de AFM<sub>1</sub> preconizada pela AOAC (2000), que recomenda como valor de aceitabilidade não inferior a 0,95 e não superior a 1,05.

#### 4.1.2 – Método de Cromatografia em Camada Delgada

##### 4.1.2.1 – Resultados dos Ensaios de Recuperação da AFM<sub>1</sub> em Amostras de Leite

A avaliação do desempenho do método analítico de CCD para determinação de AFM<sub>1</sub> foi realizada através de ensaios de recuperação com 5 níveis de contaminação (0,01, 0,02, 0,03, 0,3 e 0,5 µg/L). Dentro desses níveis de contaminação, pode-se avaliar os limites máximos tolerados pela Comunidade Européia (EC, 1998) e pela legislação brasileira (BRASIL, 2002a).



As amostras fortificadas foram preparadas em quintuplicata para cada nível de contaminação e submetidas ao método descrito no item 3.2.4.1.

Os valores médios de recuperação, a porcentagem e o coeficiente de variação obtidos a partir da fortificação das amostras de leite com padrão de AFM<sub>1</sub> estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>

CONCENTRAÇÃO DE AFM <sub>1</sub> (µg/L)	VALORES MÉDIOS (µg/L)	RECUPERAÇÃO (%)	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
0,02	0,017	85	5,8
0,03	0,025	83,3	4
0,3	0,280	93,3	2,1
0,5	0,446	89,2	4,8

Os dados obtidos pela análise das amostras para recuperação média e o coeficiente de variação demonstraram uma alta eficiência do método para baixos níveis de contaminação. Esses resultados estão coerentes com os observados por outros pesquisadores em ensaios de recuperação (DOMINGUEZ *et al.*, 1987; BAKIRCI, 2001; SHUNDO *et al.*, 2004).

A recuperação obtida foi considerada satisfatória e aceitável para AFM<sub>1</sub> pelas pequenas quantidades que foram testadas e estão também de acordo com os valores encontrados na literatura.

Nas condições em que foram realizadas as análises, o limite de detecção do método foi de 0,01 µg/L. Por se tratar de uma quantificação visual, fatores como a precisão e exatidão e a experiência do analista podem interferir no resultado da análise. Por isso, determinou-se o limite de quantificação do método que foi de 0,02 µg/L. Esses valores foram também encontrados por SHUNDO *et al.* (2004).

#### 4.1.3 – Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

##### 4.1.3.1 – Resultados dos Ensaios de Recuperação da AFM<sub>1</sub> em Amostras de Leite

O desempenho do método analítico de CLAE para determinação de AFM<sub>1</sub> foi realizada através de ensaios de recuperação com 3 níveis de contaminação (0,01, 0,02 e 0,05 µg/L).

As amostras fortificadas foram preparadas em quintuplicata para cada nível de contaminação e submetidas ao método descrito no item 3.2.5.2.

Os valores médios de recuperação, a porcentagem e o coeficiente de variação obtidos a partir da fortificação das amostras de leite com padrão de AFM<sub>1</sub> estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – VALORES MÉDIOS, RECUPERAÇÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>

CONCENTRAÇÃO DE AFM <sub>1</sub> (µg/L)	VALORES MÉDIOS (µg/L)	RECUPERAÇÃO (%)	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
0,01	0,009	90	7,7
0,02	0,020	100	5
0,05	0,041	82	14,6

Os dados obtidos pela análise das amostras para recuperação média apresentaram resultados de 90%, 100% e 82% nas concentrações de 0,01, 0,02 e 0,05 µg/L, respectivamente. Confrontando esses resultados com o coeficiente de variação, observa-se uma alta eficiência do método para baixos níveis de contaminação. Resultados de ensaios de recuperação semelhantes foram encontrados por SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO (1996); PEREIRA (2003) e SHUNDO *et al.* (2004).

A recuperação obtida foi considerada satisfatória e aceitável para AFM<sub>1</sub> pelas pequenas quantidades que foram testadas e estão também de acordo com os valores encontrados na literatura. Um fator importante que auxiliou para obter esse nível de recuperação foi a utilização de colunas de imunoafinidade na etapa de purificação.

Nas condições em que foram realizadas as análises, o limite de detecção do método foi de 0,0085 µg/L e o limite de quantificação foi determinado em 0,01 µg/L. Este valor também foi encontrado por SHUNDO *et al.* (2004).

#### 4.1.3.2 – Curva de Calibração

A curva de calibração, apresentada na Figura 10, foi construída com sete leituras repetitivas de injeções sucessivas de cada ponto da curva, sempre da menor para a maior concentração, sendo, assim, utilizada a média das leituras para a construção da curva. A curva de calibração e a equação da reta da AFM<sub>1</sub> com o valor de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) maior que 0,90 estão de acordo com as recomendações do INMETRO (2003). As Figuras 11 e 12 representam os cromatogramas do padrão de AFM<sub>1</sub> de concentração 0,06 e 0,2 µg/L, respectivamente.

FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>

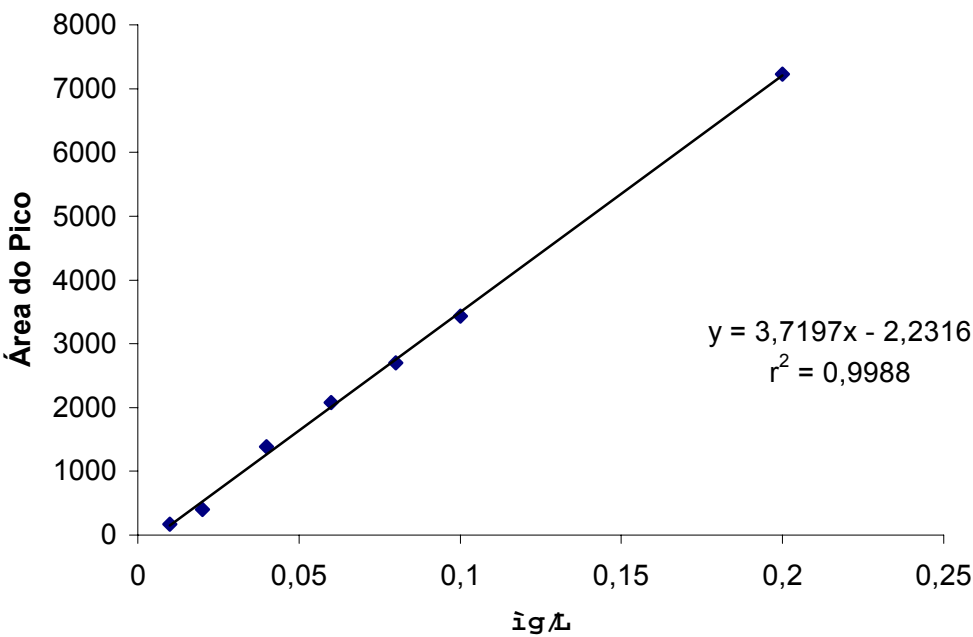


FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,06 µg/L

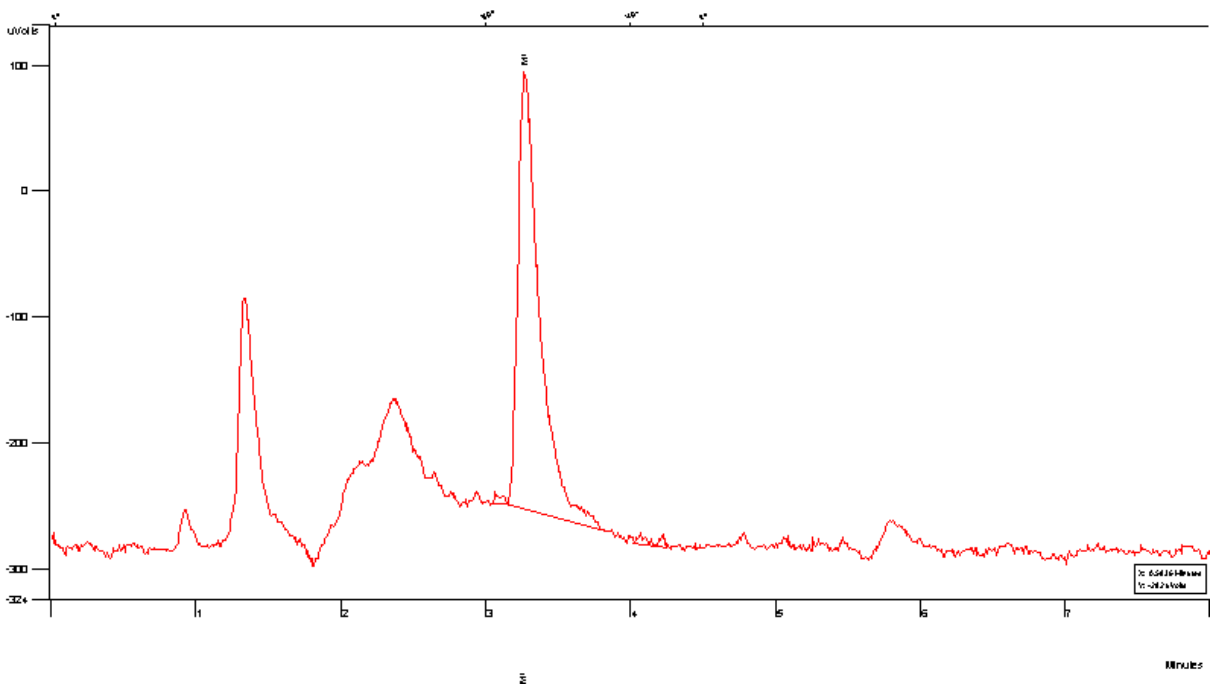
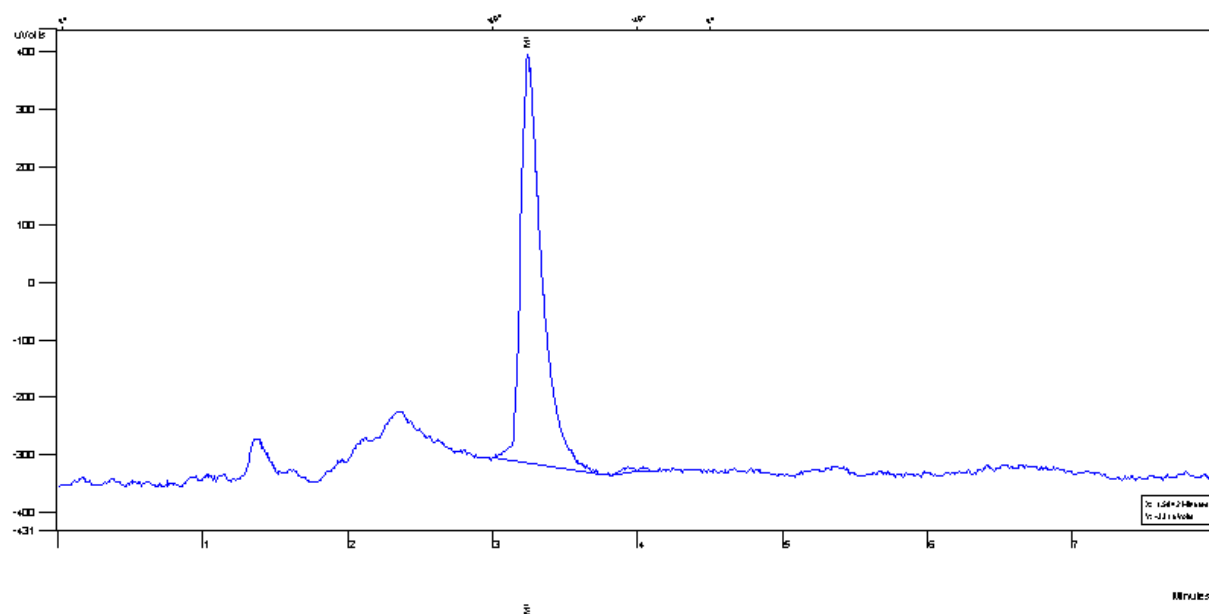


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L



#### 4.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EM LEITE PASTEURIZADO PELO MÉTODO DE CCD E CLAE

Foram analisadas 40 amostras de leite pasteurizado tipo C padronizado e homogeneizado proveniente do Estado do Paraná no período de dezembro de 2005 a março de 2006.

Os níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> encontrados nas amostras de leite estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 – RESULTADOS DOS NÍVEIS DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> ENCONTRADOS NO LEITE PASTEURIZADO PELOS MÉTODOS DE CCD E CLAE UTILIZANDO COLUNA DE IMUNOAFINIDADE\*

AMOSTRAS	CCD (µg/L)	CLAE (µg/L)	AMOSTRAS	CCD (µg/L)	CLAE (µg/L)
1	ND	0,01	21	0,16	0,17
2	ND	ND	22	ND	ND
3	ND	ND	23	ND	0,01
4	ND	ND	24	0,05	0,05
5	ND	ND	25	0,05	0,04
6	0,02	0,02	26	ND	ND
7	0,02	0,02	27	0,02	0,02
8	ND	ND	28	ND	ND
9	ND	ND	29	ND	ND
10	ND	ND	30	0,07	0,06
11	ND	0,01	31	0,08	0,07
12	ND	0,01	32	0,13	0,12
13	ND	ND	33	0,09	0,10
14	ND	ND	34	0,02	0,02
15	0,04	0,04	35	ND	0,01
16	0,14	0,10	36	ND	ND
17	0,05	0,05	37	0,06	0,06
18	0,06	0,06	38	ND	ND
19	ND	ND	39	ND	ND
20	ND	0,01	40	0,02	0,02

NOTA: ND = Não Detectado (< limite de detecção, 0,01 µg/L para CCD e 0,0085 µg/L para CLAE)

\* p = 0,7615

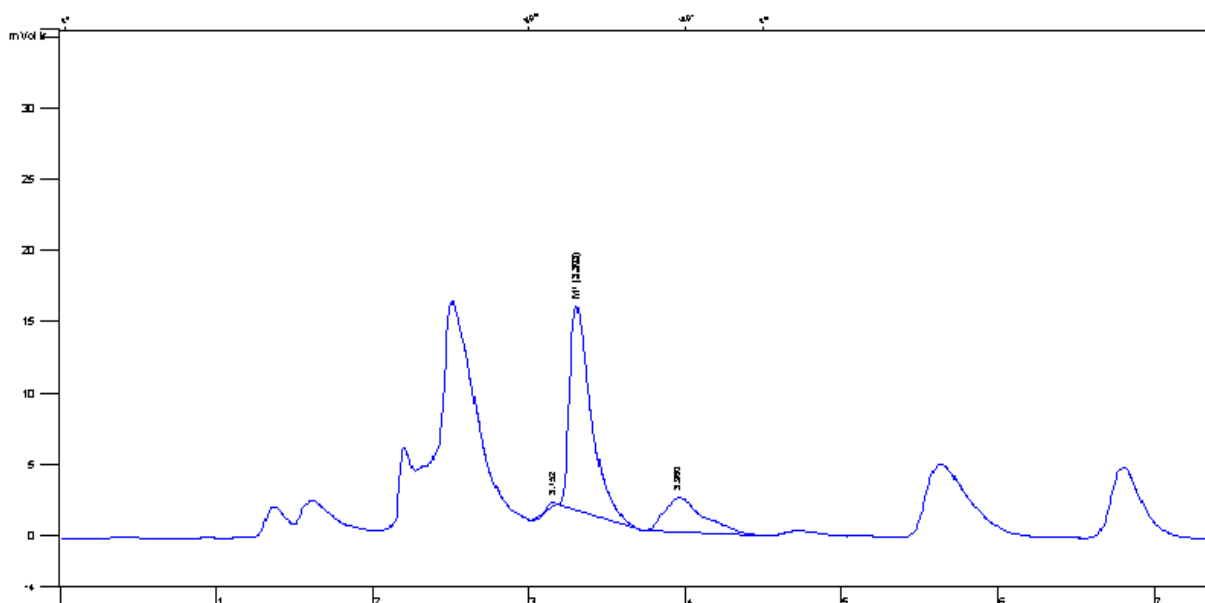
Observa-se que das 40 amostras de leite analisadas, 57,5% apresentaram AFM<sub>1</sub> na técnica de CLAE e 42,5% na técnica de CCD. Os níveis de AFM<sub>1</sub> para CLAE variaram de 0,01 a 0,17 µg/L e para CCD variaram de 0,02 a 0,16 µg/L. No entanto, todas as amostras de leite que apresentaram níveis detectáveis de aflatoxina M<sub>1</sub> encontraram-se dentro do limite máximo de 0,5 µg/L, estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002a), enquanto 8 amostras estavam com níveis acima de 0,05 µg/L, que é a tolerância máxima aceita pela Comunidade Européia (EC, 1998).

Em se tratando de exportação de derivados de leite, muitos países possuem legislação para derivados de leite com limite máximo de AFM<sub>1</sub> abaixo de 0,05 µg/L.

Isso demonstra que 20% das amostras de leite pasteurizado analisadas estariam reprovadas para produção de derivados do leite e, conseqüentemente, para a exportação. Como o processamento do leite não destrói a aflatoxina  $M_1$  e esta possui efeito cumulativo no organismo, deve-se tomar as devidas precauções para que o nível de  $AFM_1$  no leite seja reduzido ao máximo.

A Figura 13 representa o cromatograma do leite contaminado naturalmente com concentração de  $0,1 \mu\text{g/L}$  de  $AFM_1$ .

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM CONCENTRAÇÃO DE  $0,1 \mu\text{g/L}$  DE AFLATOXINA  $M_1$



O tratamento estatístico utilizado para comparar os dois métodos, CCD e CLAE, foi o teste t de Student pareado. O teste de t ( $t = 0,3073^{ns}$ ;  $p = 0,7615$ ) revelou que os resultados das análises de aflatoxina  $M_1$  no leite por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de imunoafinidade não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos por cromatografia em camada delgada

(CCD) utilizando coluna de imunoafinidade, ao nível de 5% de significância. Isso demonstra que os dois métodos usados nas análises de leite para detecção de AFM<sub>1</sub> podem ser utilizados diariamente em um laboratório de micotoxinas.

De acordo com a Tabela 6, a diferença entre os dois métodos, quanto ao nível detectado de aflatoxina M<sub>1</sub>, ocorreu em apenas seis amostras de leite pasteurizado. O motivo por essa diferença foi o limite de quantificação do método de cromatografia líquida de alta eficiência de 0,01 µg/L ser menor que o do método de cromatografia em camada delgada que foi de 0,02 µg/L.

Com este trabalho, o uso da coluna de imunoafinidade associada à técnica de CCD mostrou-se mais simplificada, eficiente e sensível, atendendo às legislações de diferentes países, comprovando seu uso pelos laboratórios com análises rotineiras e que não possuam um equipamento sofisticado como o cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Em comparação com alguns estudos de contaminação de leite com AFM<sub>1</sub> realizados no Brasil, onde os pesquisadores utilizaram coluna de imunoafinidade associada à CLAE, os resultados deste trabalho foram semelhantes aos de ROSMANINHO *et al.* (2006) que observaram em 40 amostras analisadas, 23 (57%) com níveis de AFM<sub>1</sub> entre 0,0106 – 0,1212 µg/L. PEREIRA *et al.* (2005) citaram valores de 0,0062 a 0,0741 µg/L em leite cru e nas amostras após o tratamento térmico os resultados variaram de 0,0161 a 0,0589 µg/L. GONÇALEZ *et al.* (2005) encontraram 17 amostras contaminadas das 43 analisadas, sendo que 11 (64,7%) delas estavam com concentrações acima de 0,5 µg/L, limite máximo permitido pela legislação brasileira para leite fluído. PRADO *et al.* (1999) analisaram 61 amostras, sendo que 11 eram leite em pó, 32 eram leite UHT (Ultra High Temperature) e 18 eram leite pasteurizado, e dessas amostras estavam contaminadas 10, 25 e 15, respectivamente. Das 18 amostras de leite pasteurizado, 3 apresentaram valores acima de 0,05 µg/L, que é a tolerância exigida pelos países da Europa.

GARRIDO *et al.* (2003) verificaram que das 139 amostras de leite analisadas, 111 (80%) estavam contaminadas. Das 111 amostras contaminadas com AFM<sub>1</sub>, 58 eram de leite pasteurizado e 53 eram de leite UHT, estando os dois tipos de leite com níveis de AFM<sub>1</sub> entre 0,015 – 0,5 µg/L. SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA; CARVALHO (1996) detectaram 4 amostras de leite pasteurizado contaminadas,



sendo 2 amostras de leite pasteurizado tipo B e 2 amostras de leite pasteurizado tipo C, variando entre 0,073 – 0,095 µg/L e 0,085 – 0,370 µg/L de AFM<sub>1</sub>, respectivamente.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes, quanto à técnica de CCD utilizando coluna de imunoafinidade, ao de SHUNDO; SABINO (2006) que analisaram 107 amostras de leite, sendo que em 79 (73,8%) foram encontradas AFM<sub>1</sub> com níveis variando entre 0,02 – 0,26 µg/L. Dessas 107 amostras, 22 eram leite cru, 42 eram leite UHT e 43 eram leite pasteurizado, dos quais 13, 34 e 32 amostras, respectivamente, apresentaram contaminação de aflatoxina M<sub>1</sub>. GROSSO *et al.* (2004) obtiveram resultados estatisticamente homogêneos para leite fluído e leite em pó e não apresentaram diferença estatística quando foi comparado o método de CCD na quantificação visual e com densitômetro.

Pesquisas sobre a incidência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite já foram realizadas em alguns outros países. Quando comparados com os dados deste estudo foram semelhantes ao da Itália, onde GALVANO *et al.* (1998) analisaram 159 amostras de leite fluído e 136 (86%) delas estavam contaminadas, variando de < 0,001 – 0,108 µg/L, e 97 amostras de leite em pó estando 81 (84%) delas contaminadas com variação de < 0,001–0,101 µg/L. GALVANO *et al.* (2001) encontraram 125 (78%) amostras de leite fluído contaminadas das 161 amostras analisadas, variando de <0,001 – 0,023 µg/L, e 50 (54%) amostras de leite em pó contaminadas das 92 amostras analisadas, variando de < 0,001 – 0,079 µg/L.

Na Espanha, VELASCO; DELSO e ESCUDERO (2003) detectaram AFM<sub>1</sub> entre 0,014 – 0,025 µg/L. Na Grécia, ROUSSI *et al.* (2002) analisaram 136 amostras de leite pasteurizado estando contaminadas 113 (83%) amostras com níveis de aflatoxina M<sub>1</sub> entre < 0,005 – 0,050 µg/L. MARKAKI e MELISSARI (1997) detectaram níveis de contaminação entre 0,010 – 0,177 µg/L. Na Coréia, KIM *et al.* (2000) encontraram 39 amostras de leite contaminadas e os níveis variavam entre 0,015 – 0,052 µg/L. No Kuwait, SRIVASTAVA *et al.* (2001) observaram que das 9 amostras de leite, 5 apresentaram-se contaminadas com níveis de 0,21 e 0,20 µg/L. Na Turquia, BAKIRCI (2001) relatou nível de 0,043 µg/L de AFM<sub>1</sub> em leite pasteurizado.

De acordo com BLANCO *et al.* (1988); GALVANO; GALOFARO e GALVANO (1996); SAITANU (1997); SRIVASTAVA *et al.* (2001); ROUSSI *et al.* (2002) e

KAMKAR (2005), o fato de não se encontrar altos níveis de contaminação em leite comercial é devido à mistura que ocorre nos tanques de acondicionamento de leite por amostras de leites contaminadas com aquelas que tenham baixa ou nenhuma contaminação de AFM<sub>1</sub>. Também se deve levar em conta a época em que o leite foi coletado, já que no verão, como é o caso deste trabalho, o leite apresenta-se menos contaminado, pois o gado se alimenta, em sua maior parte, de pastagens. Diante desses fatos, pode-se afirmar que a contaminação por aflatoxinas depende das condições ambientais que, por sua vez, não podem ser controladas.

As crianças, assim como os animais jovens, são mais sensíveis aos efeitos tóxicos das aflatoxinas. Em relação ao adulto, bem como crianças maiores, uma das principais consequências da contaminação do leite com AFM<sub>1</sub> é a sua contribuição para o aumento da ingestão total de aflatoxinas.

Esses fatores reforçam a necessidade do controle desta micotoxina no leite e seus derivados. Para isso, é fundamental que os programas de monitoramento estabeleçam a necessidade de estudos que avaliem o impacto dos níveis de exposição a aflatoxina M<sub>1</sub> sobre a saúde humana.

A presença de micotoxinas em produtos destinados ao consumo humano coloca em risco a segurança da saúde da população. As boas práticas agrícolas, de transporte, de manufatura e de armazenagem continuam sendo a melhor forma de prevenir a contaminação de alimentos por aflatoxinas e, conseqüentemente, a contaminação do leite. Assim, estratégias e instrumentos legais são necessários na agricultura e na indústria de alimentos para assegurar a qualidade de produtos de origem animal (GONÇALEZ *et al.*, 2004).

## 5. CONCLUSÕES

---

Face aos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os dois métodos utilizados, CCD e CLAE, para a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite são eficientes e não são diferentes estatisticamente.
- O método de CCD associado à coluna de imunoafinidade mostrou-se específico, sensível e preciso. Apresentou recuperações com limite de quantificação igual a 0,02 µg/L, detectando baixas concentrações de AFM<sub>1</sub>.
- O método de CLAE associado à coluna de imunoafinidade mostrou ser melhor quanto à especificidade, sensibilidade e precisão com limite de quantificação igual a 0,01 µg/L. Apresentou recuperações melhores que a do método de CCD.
- Os valores obtidos de aflatoxina M<sub>1</sub> nas amostras de leite pasteurizado analisadas (0,01 – 0,17 µg/L) apresentaram-se dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira (0,5 µg/L) para leite fluído. No entanto, em outros países a legislação para AFM<sub>1</sub> é mais exigente sendo o limite máximo 10 vezes menor que o especificado pela legislação brasileira, de modo que das 40 amostras analisadas 8 amostras não seriam aceitas para comercialização.

## REFERÊNCIAS

---

ABOUZIED, M. M.; HORVATH, A. D.; PODLESNY, P. M.; REGINA, N. P.; METODIEV, V. D.; KAMENOVA-TOZEVA, R. M.; NIAGOLOVA, N. D.; STEIN, A. D.; PETROPOULOS, E. A.; GANEV, V. S. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 8, p. 755-764, 2002.

ALBUQUERQUE, L. C. **O leite em suas mãos**, v. 3, Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 1997. 150p.

AMADO, M. A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. **Millenium - Revista do ISPV**, v. 26, 2002.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 ed., v. 2. Gaithersburg, 2000.

APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.

ARBILLAGA, L.; EZPELETA, O.; LOPEZ DE CERAIN, A. Es la ocratoxina A una micotoxina mutagénica? **Revista Toxicologica**, v. 21, p. 1-10, 2004.

ATUI, M. B.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

AYCICEK, H.; AKSOY, A.; SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 16, p. 263-266, 2005.

BABABUNMI, E. A.; THABREW, I.; BASSIR, O. Aflatoxin - induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 34, p. 161-181, 1980.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, v. 12, p. 47-51, 2001.

BAÑUELOS, M. T. A.; MORENO, M. C.; PEÓN, N. R.; ROJO, F. Aduetos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. **Revista Cubana de Oncología**, v. 16, n. 1, p. 35-39, 2000.

BECKWITH, A. C.; STOLOFF, L. Fluorodensitometric measurement of aflatoxin thin layer chromatograms. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 51, p. 602-608, 1968.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BLANCO, J. L.; DOMÍNGUEZ, L.; GOMEZ-LUCIA, E.; GARAYZABAL, J. F. F.; GARCÍA, J. A.; SUÁREZ, G. Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in commercial ultra-high-temperature-treated milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1622-1623, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 56, de 04 de novembro de 1994 do MERCOSUL/GMC - Mercosul. Grupo Mercado Comum. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas. **MERCOSUL/GMC - Mercosul**. Grupo Mercado Comum. A presente Resolução entrará em vigor no dia 1º de janeiro de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, de 16 de outubro de 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, de 18 de setembro de 2002b.

BRUCE, R. D. Risk assessment for aflatoxin: II. Implications of human epidemiology data. **Risk Analysis**, v. 10, n. 4, p. 561-569, 1990.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M. H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 7, p. 655-665, 2002.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

BUSBY, W. F. Jr.; GOLDMAN, M. E.; NEWBERNE, P. M.; WOGAN, G. N. Tumorigenicity of fluoranthene in a newborn mouse lung adenoma bioassay. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 10, p. 1311-1316, 1984.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CARRILLO, L. **Los Hongos de los Alimentos y Forrajes**. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/06htextofusarios.pdf>> Acesso em: 15 dez. 2004.

CARRILLO, L. **Microbiologia Agrícola**. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2005.

CARVALHO, E.C.Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 27-31, 1995.

CHIAVARO, E.; LEPIANI, A.; COLLA, F.; BETTONI, P.; PARI, E.; SPOTTI, E. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 6, p. 575-581, 2002.

CHOY, W. N. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B<sub>1</sub> and its implications to quantitative cancer-risk assessment. **Mutation Research**, v. 296, n. 3, p. 181-198, 1993.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

CIB. CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Biotech**. Ano 2, n. 5, 2004. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/biotech09.pdf>> Acesso em: 16 dez. 2005.

CODEAGRO. COORDENADORIA DE DESENVOLVIMENTO DOS AGRONEGÓCIOS. Portal do Governo do Estado de São Paulo. **VivaLeite – O Leite**. Disponível em: <<http://www.codeagro.sp.gov.br/vivaleite/vivaleite.php?pg=5>> Acesso em: 24 nov. 2005.

COULTER, J. B.; SULIMAN, G. I.; LAMPLUGH, S. M.; MUKHTAR, B. I. HENDRICKSE, R. G. Aflatoxins in liver biopsies from Sudanese children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 360-365, 1986.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

CULLEN, J. M.; RUEBNER, B. H.; HSIEH, L. S.; HYDE, D. M.; HSIEH, D. S. P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M<sub>1</sub> in male Fisher rats compared to aflatoxin B<sub>1</sub>. **Cancer Research**, v. 47, p. 1913-1917, 1987.

CURCOVA, V.; LANGROVA, E.; AKAO, M. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on myelopoiesis in vitro. **Toxicology**, v. 70, p. 203-211, 1991.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30. n. 1, p. 137-141, 2000.

DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J. L.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E. F.; SUAREZ, G. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 70, n. 3, p. 470-472, 1987.

DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.

EC. EUROPEAN COMMUNITIES – COMMISSION DIRECTIVE 98/53/EC. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 93-101, 1998.

EL-NEZAMI, H. S.; NICOLETTI, G.; NEAL, G. E.; DONOHUE, D. C.; AHOKAS, J. T. Aflatoxin M<sub>1</sub> in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 173-179, 1995.



ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K.; OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência de Informação. **Valor Nutritivo**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_167\\_21720039245.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_167_21720039245.html)> Acesso em: 14 dez. 2005a.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência de Informação. **Tendência do Mercado de Leite**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_486\\_217200392422.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_486_217200392422.html)> Acesso em: 14 dez. 2005b.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Notícias. **Produção de leite no Brasil cresceu 131% desde 1980**. Disponível em: <<http://www.cnpagl.embrapa.br/>> Acesso em: 12 jul. 2006a.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Artigos. **O leite de que o Brasil precisa**. Disponível em: <<http://www.cnpagl.embrapa.br/jornaleite/artigo.php?id=11>> Acesso em: 10 mar. 2006b.

FRAGA, M. E.; DIREITO, G. M.; SANTANA, D. M. N.; BARROS, G. C.; ROSA, C. A. R. Determinação por cromatografia em camada delgada de aflatoxina B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> e aflatoxicol em ovos comercializados. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 4, p.172-175, 1996.

GARNER, R. C.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. In:

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; ANGELIS, A.; GALVANO, M.; BOGNANNO, M.; GALVANO, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p. 738-741, 1998.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; RITIENI, A.; BOGNANNO, M.; ANGELIS, A.; GALVANO, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy: second year of observation. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 7, p. 644-646, 2001.

GARRIDO, N. S.; IHA, M. H.; ORTOLANI, M. R. S.; FÁVARO, R. M. D. Occurrence of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 70-73, 2003.

GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, p. 37-48, 1993.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; MANGINELLI, S.; FELICIO, J. D. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 171-174, 2004.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H.; NOGUEIRA, J. H. C.; MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite comercializado em alguns

municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 435-438, 2005.

GROOPMAN, J. D.; CAIN, L. G.; KENSLER, T. W. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 113-145, 1988.

GROOPMAN, J. D.; ZHU, J. Q.; DONAHUE, P. R.; PIKUL, A.; ZHANG, L. S.; CHEN, J. S.; WOGAN, G. N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in peoples living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. In: BAÑUELOS, M. T. A.; MORENO, M. C.; PEÓN, N. R.; ROJO, F. Aductos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. **Revista Cubana de Oncología**, v. 16, n. 1, p. 35-39, 2000.

GROSSO, F.; FREMY, J. M.; BEVIS, S.; DRAGACCI, S. Joint IDF-IUPAC-IAEA (FAO) interlaboratory validation for determining aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by using immunoaffinity clean-up before thin-layer chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 4, p. 348-357, 2004.

HANSEN, T. J. Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 1, p. 75-77, 1990.

HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v. 51, n. 18, p. 5023-5044, 1991.

HASSANIN, N. I. Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of yoghurt-cheese and acidified milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 31-34, 1994.

HENDRICKSE, R. G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. **Pediatrics**, v. 88, p. 376-379, 1991.

HENRY, S. H.; WHITAKER, T.; RABBANI, I.; BOWERS, J.; PARK, D.; PRICE, W.; BOSCH, F. X.; PENNINGTON, J.; VERGER, P.; YOSHIZAWA, T.; VAN EGMOND, H.; JONKER, M. A.; COKER, R. **Aflatoxin M<sub>1</sub>**, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm#2.2.1>> Acesso em: 24 fev. 2006.

HSIEH, D. P. H.; BELTRAN, L. M.; FUKAYAMA, M. Y.; RICE, D. W.; WONG, J. J. Production and isolation of aflatoxin M<sub>1</sub> for toxicological studies. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 69, n. 3, p. 510-512, 1986.

HSIEH, D. P.; ATKINSON, D. N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 283, p. 525-532, 1991.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**, 4. ed. São Paulo, 2004. 1004p.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO. World Health Organization. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 19-23, 1993.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em: 24 maio 2006.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Revisão: 01 – março/2003. 35 p.

JACOBSEN, B. J.; BOWEN, K. L.; SHELBY, R. A.; DIENER, U. L.; KEMPPAINEN, B. W.; FLOYD, J. **Mycotoxins and Mycotoxicoses**, Circular ANR-767. Disponível em: <<http://www.aces.edu/dept/grain/ANR-767.php>> Acesso em: 14 out. 2005.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. **Anais do Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. p. 242-261.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran. **Food Control**, v. 16, n. 7, p. 593-599, 2005.

KANIOU-GRIGORIADOU, I.; ELEFThERIADOU, A.; MOURATIDOU, T.; KATIKOU, P. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. **Food Control**, v. 16, p. 257-261, 2005.

KATZ, S. E.; SIEWIERSKI, M. Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 403-409, 1992.

KEEHN, D. M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nursing**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.

KIM, E. K.; SHON, D. H.; RYU, D.; PARK, J. W.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 1, p. 59-64, 2000.

KLEIN, P. J.; BUCKNER, R.; KELLY, J.; COULOMBE, R. A. Jr. Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B<sub>(1)</sub>. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 45-52, 2000.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2453-2455, 2005.

LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 211-215, 2001.

MARTINS, J. L. S.; MARTINS, I. S. Aflotoxina M<sub>1</sub> no leite Tipo B comercializado no Município de São Paulo, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.

MALLMANN, C. A.; KOWALSKI, C. H.; ALMEIDA, C. A.; MÜRMANN, L.; SILVEIRA, V. G. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no Estado do Rio Grande Do Sul. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 2003, Florianópolis. **Anais do Simpósio em Ciência de Alimentos**. Florianópolis, 2003.

MCKINNEY, J. D.; CAVANAGH, G. C.; BELL, J. T.; HOVERSLAND, A. S.; NELSON, D. M.; PEARSON, J.; SELKIRK, R. J. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 50, n. 3, p. 79-84, 1973.

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 65, n. 2, p. 163-192, 1995.

MARKAKI, P.; MELISSARI, E. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 5, p. 451-456, 1997.

MELO, M. M.; NASCIMENTO, E. F.; OLIVEIRA, N. J. F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B<sub>1</sub> presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, 1999.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY, **MSTATC**, versão 2.10, East Lansing, MI, 1989. 1 disquete 3½, MSDOS.

MORTIMER, D. N.; GILBERT, J.; SHEPHERD, M. J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, p. 393-398, 1987.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3375-3379, 2002.

NEAL, G. E.; EATON, D. L.; JUDAH, D. J.; VERMA, A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in human-derived in vitro systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 151, n. 1, p. 152-158, 1998.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

OGIDO, R. **Efeitos da exposição prolongada da aflatoxina B<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>1</sub> em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos**. 2003. 110p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997.

OLUBUYIDE, I. O. The natural history of primary liver cell carcinoma: a study of 89 untreated adult Nigerians. **The Central African Journal of Medicine**, v. 38, n. 1, p. 25-30, 1992.

PÁDUA, I. P. M.; SILVEIRA I. A.; MARTINS, C. E. C. B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**, v. 1, n. 1, 2002.

PARKIN, D. M.; STJERNSWARD, J.; MUIR, C. S. Estimatives of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bulletin World Health Organization**, v. 62, n. 2, p. 163-182, 1984.

PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M<sub>1</sub> em leite**. 2003. 86p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G.; ROSA, C. A. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da Região de Marília – SP/Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO J.; FAGUNDES, H.; CORREA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.



PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, C. R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto /98 à abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 420-423, 1999.

PURCHASE, I. F. Aflatoxin residues in food of animal origin. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 531-544, 1972.

PURCHASE, I. F.; STEYN, M.; RINSMA, R.; TUSTIN, R. C. Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 383-387, 1972.

PURCHASE, I. F. H.; STEYN, M. Estimation of aflatoxin M in milk. **Journal of the AOAC**, v. 50, n. 2, p. 363-366, 1967.

QUEZADA, T.; CUELLAR, H.; JARAMILLO-JUAREZ, F.; VALDIVIA, A. G.; REYES, J. L. Effects of aflatoxin B<sub>(1)</sub> on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP**, v. 125, n. 3, p. 265-272, 2000.

RASTOGI, S.; DWIVEDI, P. D.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Detection of Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and infant milk products from Indian markets by Elisa. **Food Control**, v. 15, p. 287-290, 2004.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. Aflatoxina M<sub>1</sub> e ácido ciclopiazônico em leites de consumo comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, III JIPCA, p. 55-59, 2006.

ROUSSI, V.; GOVARIS, A.; VARAGOULI, A.; BOTSOGLOU, N. A. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and market milk commercialized in Greece. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 9, p. 863-868, 2002.

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Separação e determinação das aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 44, n. 2, p. 87-100, 1984.

SAITANU, K. Incidence of aflatoxinas M<sub>1</sub> in Thai milk products. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 8, p. 1010-1012, 1997.

SALLE, C. T. P.; LORENZINI, G.; SFOGGIA, M.; CÉ, M. C.; GUAHIBA, A. S.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, F. O. Presença de aflatoxinas em fígados de frangos de corte criados a campo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n. 2, p. 101-106, 2001.

SANTOS, E. A.; VARGAS, E. A. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 5, p. 447-458, 2002.

SCOTT, P. M. Methods for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products - a review of performance characteristics. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, n. 3, p. 283-305, 1989.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998.

SHARMAN, M.; GILBERT, J. Automated aflatoxin analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatographic determination. **Journal of Chromatography**, v. 543, n. 1, p. 220-225, 1991.

SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; SABINO, M. Otimização da determinação da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 43-48, 2004.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, 2006.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, 1999.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; CASTRO, L.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite por cromatografia em camada delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 213-220, 2003.

SRIVASTAVA, V. P.; BU-ABBAS, A.; ALAA-BASUNY; AL-JOHAR, W.; AL-MUFTI, S.; SIDDIQUI, M. K. J. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 993-997, 2001.

STERN, M. C.; UMBACH, D. M.; YU, M. C.; LONDON, S. J.; ZHANG, Z. Q.; TAYLOR, J. A. Hepatitis B, aflatoxin B<sub>1</sub>, and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 10, n. 6, p. 617-625, 2001.

STOLOFF, L.; TRUCKSESS, M.; HARDIN, N.; FRANCIS, O. J.; HAYES, J. R.; POLAN, C. E.; CAMPBELL, T. C. Stability of aflatoxin M in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, 1975.

STOLOFF, L. Carcinogenicity of aflatoxins. **Science**, v. 237, n. 4820, p. 1283-1284, 1987.

STUBBLEFIELD, R. D. The rapid determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products. In: SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Separação e determinação das aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 44, n. 2, p. 87-100, 1984.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub>. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97, 1996.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.

TINÔCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R.; BEZ, F.; BARCELLOS, R. M. C. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.

TUINSTRA, L. G. M.; ROOS, A. H.; VAN TRIJP, J. M. P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 76, n. 6, p. 1248-1254, 1993.

TUNG, H. T.; WYATT, R. D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P. B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 320-326, 1975.

VAN EGMOND, H. P., DEKKER, W. H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. **Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 332-336, 1995.

VELASCO, M. L. R.; DELSO, M. M. C.; ESCUDERO, D. O. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw cow's milk. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 3, p. 276-280, 2003.

VICAM. **About AflaM<sub>1</sub> HPLC**, Products. Disponível em: <<http://www.vicam.com/products/afla-m1.html>> Acesso em: 08 jun. 2005.

WANG, J. S.; GROOPMAN, J. D. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 167-181, 1999.

WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. Stability of aflatoxin-M<sub>1</sub> during manufacture and storage of a butter-like spread, non-fat dried milk and dried buttermilk. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 7, p. 633-636, 1983.

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 374, p. 123-137, 1992.

## APÊNDICES

---

**APÊNDICE 1** – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> DE CONCENTRAÇÃO 0,1 µg/L



**APÊNDICE 2 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> DE  
CONCENTRAÇÃO 0,2 µg/L**





**APÊNDICE 3 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM  
CONCENTRAÇÃO DE 0,06 µg/L DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>**



**APÊNDICE 4 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM  
CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µg/L AFLATOXINA M<sub>1</sub>**



**APÊNDICE 5 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LEITE COM  
CONCENTRAÇÃO DE 0,17 µg/L AFLATOXINA M<sub>1</sub>**

